

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**

**E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**

**“Estudio de la incidencia de hongos toxicogénicos en uvas  
destinadas a la producción de vinos”**

**TESIS**

**Para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutica**

**AUTOR**

**ANDREA SUSANA VARGAS TRINIDAD**

**ASESOR**

**FERNANDO GILBERT QUEVEDO GANOZA**

**Lima – Perú**

**2014**



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**  
**DECANATO**



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

**ESTUDIO DE LA INCIDENCIA DE HONGOS TOXICOGÉNICOS EN UVAS DESTINADAS A LA PRODUCCIÓN DE VINOS**

que presenta la Bachiller en Farmacia y Bioquímica:


**ANDREA SUSANA VARGAS TRINIDAD**


Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación ha obtenido la siguiente calificación:

*Diecinueve (19) con Menciones*

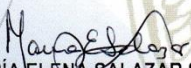
en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 21 de octubre del 2014

  
**Dr. EDUARDO FLORES JUÁREZ**  
Presidente

  
**Dr. GERARDO GAMARRA BALLENA**  
Miembro

  
**Q.F. VICTORIA JUSAYE YREI YAMAKAWA**  
Miembro

  
**Mgtr. MARÍA ELENA SALAZAR SALVATIERRA**  
Miembro

**"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"**

## AGRADECIMIENTOS

*Pero gracias a Dios, que en Cristo siempre nos lleva en triunfo, y que por medio de nosotros manifiesta en todo lugar la fragancia de su conocimiento. 2 Corintios 2:14*

*Agradezco a Dios, por la vida, y por haberme permitido vivir esta fascinante aventura en Argentina.*

*A mis padres, Alipio Vargas y Juana Trinidad, por su confianza y apoyo incondicional a mis sueños y metas profesionales, por inspirarme día a día y generar en mí las ganas de seguir adelante. Espero nunca decepcionarlos y retribuirles con más el gran amor que siempre me brindan.*

*A mis familiares en Argentina, mis tíos Rosamel y Javier, mi prima Milena, por la calurosa recepción y estadía en tierras lejanas. A mis familiares en Perú; mis hermanos Marcos, Mery, Jannet, Jesús y Daniel por el aliento a mis sueños.*

*Mis sinceros agradecimientos al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por colaborar con el financiamiento de la tesis, a su vez a la Universidad de Buenos Aires por permitirme llevar a cabo la investigación en sus instalaciones y el apoyo brindado.*

*Agradezco a mi asesor de tesis, Dr. Fernando Quevedo Ganoza, por compartir el interés por el encantador mundo de la Enología, por la orientación en este proyecto, y el constante apoyo a lo largo del tiempo. Siempre podemos aprender algo nuevo e interesante de usted.*

*Agradezco a mi co-asesora de tesis, Dra. Virginia Fernández Pinto por la dedicación y respaldo, por compartir sus conocimientos, mi más sincero agradecimiento.*

*A mi jurado examinador y calificador, los Doctores Eduardo Flores, Gerardo Gamarra, Victoria Yrei y María Elena Salazar, por sus acertadas correcciones y mejoras en la redacción de la tesis.*

*Agradezco a la Dras. Andrea Patriarca, Stella Romero, Gabriela Larumbe por la constante orientación y paciencia, y por permitir incorporarme al grupo de investigación. A mis compañeras del Laboratorio L 16, Lucía Da Cruz y Sandra Vaquera por las explicaciones prácticas y la paciencia que siempre me tuvieron. A Diana Ramirez, Mónica Sepúlveda y Verónica Villalba por la amistad, por las innumerables buenas experiencias, por compartir sus costumbres y sueños, por convertir un día de trabajo en una agradable experiencia. A Nilda y Betty por el alegre recibimiento de cada mañana.*

*A mis amigas en Argentina, Silvia y Etel por el apoyo incondicional. A mis eternos amigos en Perú, por escucharme y alentarme a culminar mis objetivos, y no desfallecer en el camino; siempre los recuerdo y quiero, Nino, Gisela, Zaida y Rosmery.*

# ÍNDICE

RESUMEN.....	I
SUMMARY .....	II
ABREVIATURAS .....	III
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivo principal.....	2
1.2 Objetivos secundarios .....	2
2. GENERALIDADES.....	3
2.1 Uvas .....	3
2.1.1 Producción mundial de uvas.....	4
2.1.2 Producción de uvas en Argentina .....	5
2.1.3 Producción de uvas en el Perú .....	7
2.2 Hongos y micotoxinas .....	8
2.2.1 Micobiota de uvas.....	8
2.2.2 Micotoxinas.....	11
2.3 Género <i>Alternaria</i> .....	16
2.3.1 Taxonomía.....	16
2.3.2 Identificación .....	17
2.3.3 Toxinas.....	19
2.3.4 Patologías importantes producidas por <i>Alternaria</i> .....	20
2.4 Género <i>Penicillium</i> .....	21
2.4.1 Taxonomía.....	21
2.4.2 Identificación .....	22
2.4.3 Toxinas.....	22
2.4.4 Patologías en uvas.....	24
3. MATERIALES .....	25
4. MÉTODOS.....	28
4.1 Muestreo.....	28
4.2 Aislamiento y Conservación .....	29
4.2.1 Aislamiento .....	29
4.2.2 Conservación .....	29
4.3 Identificación .....	30

4.3.1 <i>Alternaria</i> .....	30
4.3.2 <i>Penicillium</i> .....	32
4.4 Determinación de la capacidad toxicogénica de los aislamientos de <i>Alternaria</i> para la producción de las micotoxinas más comunes (AOH, AME, AT).....	34
4.4.1 Producción de toxinas .....	34
4.4.2 Extracción de toxinas.....	34
4.4.3 Análisis de toxinas.....	37
4.4.4 Sistema de solventes y detección.....	37
4.4.5 Determinación cuantitativa de las toxinas extraídas.....	37
4.5 Determinación de la capacidad toxicogénica de los aislamientos de <i>Penicillium expansum</i> .....	38
4.5.1 Producción de toxinas .....	38
4.5.2 Extracción de toxinas.....	38
4.5.3 Análisis de toxinas.....	39
4.5.4 Sistema de solventes y detección.....	39
4.5.5 Determinación de toxinas extraídas .....	39
4.6 Determinación de la patogenicidad de los aislamientos de <i>P. expansum</i> .....	40
4.7 Determinación de la producción de patulina en sustrato natural.....	42
5. RESULTADOS.....	44
5.1 Aislamiento e identificación .....	44
5.1.1 <i>Alternaria</i> .....	44
5.1.2 <i>Penicillium</i> .....	47
5.2 Determinación de la capacidad toxicogénica de los aislamientos de <i>Alternaria</i> . Producción de las micotoxinas más comunes (AOH, AME, AT) .....	49
5.3 Determinación de la capacidad toxicogénica de los aislamientos de <i>Penicillium expansum</i> .....	54
5.4 Determinación de la patogenicidad de los aislamientos de <i>Penicillium expansum</i> . .....	56
5.5 Determinación de la producción de Patulina en sustrato natural .....	59
6. DISCUSIÓN.....	61
7. CONCLUSIONES.....	66
8. RECOMENDACIONES O PERSPECTIVAS FUTURAS.....	67
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68
10. ANEXOS .....	75

10.1 MEDIOS DE CULTIVO .....	75
10.2 TABLAS DE DATOS .....	78
10.3 FIGURAS .....	88

## FIGURAS

<b>Fig. N°1:</b>	Evolución de la superficie mundial de viñedos.	4
<b>Fig. N°2:</b>	Principales países productores de vino a nivel mundial.	4
<b>Fig. N°3:</b>	Regiones vitivinícolas argentinas.	6
<b>Fig. N°4:</b>	Producción vitícola del Perú (millones de litros).	7
<b>Fig. N°5:</b>	<i>Alternaria</i> spp.	16
<b>Fig. N°6:</b>	Modelos de esporulación de los grupo-especie: A) <i>A. tenuissima</i> . B) <i>A. arborescens</i> . C) <i>A. alternata</i> .	18
<b>Fig. N°7:</b>	Estructura química de AOH, AME, ALT, ATX I-III y AT.	19
<b>Fig. N°8:</b>	Diversos niveles de lesión en uvas de mesa, producidas por <i>Alternaria</i> spp. según el grado de patogenicidad.	20
<b>Fig. N°9:</b>	<i>Penicillium expansum</i> . A) Conidióforos terverticilados. B) Conidios elipsoidales.	22
<b>Fig. N°10:</b>	Estructura química de patulina.	23
<b>Fig. N°11:</b>	Podredumbre de los racimos causada por <i>Penicillium</i> spp.	24
<b>Fig. N°12:</b>	Esquema del procedimiento para obtener cultivos monospóricos de <i>Alternaria</i> .	31
<b>Fig. N°13:</b>	Procedimiento experimental seguido para identificar los aislamientos de <i>Alternaria</i> .	31
<b>Fig. N°14:</b>	Esquema del procedimiento de siembra en los medios de identificación de <i>Penicillium</i> .	33
<b>Fig. N°15:</b>	Siembra del inóculo en medio arroz para la producción de micotoxinas.	35
<b>Fig. N°16:</b>	Procedimiento para la extracción de AOH, AME y AT.	36
<b>Fig. N°17:</b>	Forma de obtener plugs (sacabocados). A) Del medio CYA. B) Del medio YES.	38
<b>Fig. N°18:</b>	Procedimiento para la determinación de la patogenicidad.	41

<b>Fig. N°19:</b>	Procedimiento de extracción de patulina.	43
<b>Fig. N°20:</b>	Observaciones microscópicas de los grupo-especies de <i>Alternaria</i> de cultivos de 7 días en PZA: A) <i>Alternaria arborescens</i> . B) <i>Alternaria alternata</i> . C) <i>Alternaria tenuissima</i> . D)Observación macroscópica.	45
<b>Fig. N°21:</b>	Porcentaje de distribución de grupo-especies de <i>Alternaria</i> .	47
<b>Fig. N°22:</b>	<i>Penicillium expansum</i> . A) Observación microscópica. B) Cultivo de 7 días en PDA. C) Cultivo de 7 días en CYA	48
<b>Fig. N°23:</b>	Cromatogramas de aislamientos. A) AT:1V2. B) AOH y AME:8R2.	50
<b>Fig. N°24:</b>	Co-producción de toxinas de <i>Alternaria</i> .	51
<b>Fig. N°25:</b>	Curva de calibración AT estándar.	52
<b>Fig. N°26:</b>	Curva de calibración AOH estándar.	53
<b>Fig. N°27:</b>	Curva de calibración AME estándar.	53
<b>Fig. N°28:</b>	Cromatogramas. A) AT estándar. B) AOH y AME estándares.	53
<b>Fig. N°29:</b>	<i>Penicillium expansum</i> cultivo de 7 días, anverso y reverso A) CYA. B) YES.	55
<b>Fig. N°30:</b>	Curva de calibración de patulina estándar.	55
<b>Fig. N°31:</b>	Cromatograma del estándar de patulina	55
<b>Fig. N°32:</b>	Cromatograma del aislamiento 6 V7.	55
<b>Fig. N°33:</b>	Porcentaje de cepas según el grado de patogenicidad en manzanas.	58
<b>Fig. N°34:</b>	Lesión típica producida por <i>Penicillium expansum</i> en el exterior de manzanas.	58
<b>Fig. N°35:</b>	Cromatograma del aislamiento 15 V7.	60



## TABLAS

<b>Tabla N°1:</b>	Principales micotoxinas producidas por <i>Penicillium</i> spp.	23
<b>Tabla N°2:</b>	Muestreo. Se detalla la localidad de origen de las muestras.	28
<b>Tabla N°3:</b>	Detalle de los aislamientos de <i>Alternaria</i> obtenidos a partir de cada muestra analizada.	44
<b>Tabla N°4:</b>	Identificación de los aislamientos obtenidos del género <i>Alternaria</i> .	46
<b>Tabla N°5:</b>	Aislamientos de <i>Penicillium</i> obtenidos a partir de cada muestra analizada.	47
<b>Tabla N°6:</b>	Procedencia de los 43 aislamientos de <i>P. expansum</i> .	48
<b>Tabla N°7:</b>	Perfiles de producción de micotoxinas de <i>Alternaria</i> .	50
<b>Tabla N°8:</b>	Producción de micotoxinas de los grupo-especies de <i>Alternaria</i> .	52
<b>Tabla N°9:</b>	Producción de patulina en medio de cultivo.	54
<b>Tabla N°10:</b>	Evaluación de la patogenicidad según la lesión en manzanas	56
<b>Tabla N°11:</b>	Ponderación del grado de patogenicidad.	57
<b>Tabla N°12:</b>	Comparación de aislamientos de <i>P. expansum</i> según el grado de patogenicidad.	57
<b>Tabla N°13:</b>	Producción de patulina por aislamientos de <i>P. expansum</i> en sustrato natural.	59

## RESUMEN

Existen muy pocos datos sobre la incidencia de hongos toxicogénicos en uvas cultivadas en Sudamérica. Los estudios realizados son orientados principalmente a la determinación de especies potenciales productoras de OTA, principal micotoxina regulada en vinos a nivel mundial. Así mismo, es escasa la información sobre la incidencia de otras especies toxicogénicas y sus toxinas en uvas, jugos y vinos de la región. El objetivo de la investigación consistió en aislar e identificar hongos potencialmente toxicogénicos de uvas cultivadas en la provincia de Río Negro, Argentina y determinar la capacidad toxicogénica de los mismos. Se analizaron 10 muestras de uvas de variedad Malbec de los viñedos de las localidades de Villa Azul y Maiqué en la Provincia de Río Negro. Se aislaron 441 cepas de hongos, de los cuales el 40.8% pertenece al género *Penicillium* y el 21.8% al género *Alternaria*. Se realizó la identificación a nivel grupo-especie de los aislamientos pertenecientes éstos géneros. Se obtuvieron 85 aislamientos pertenecientes al género *Alternaria*, de los cuales 5 pertenecían al grupo-especie *A. alternata*, 5 al grupo-especie *A. arborescens* y 75 al grupo-especie *A. tenuissima*. Así mismo, se determinaron los perfiles de producción (AOH, AME y AT) de los aislamientos, encontrándose que todos produjeron al menos una toxina y el 66% produjeron tres toxinas. Del mismo modo, se identificaron 43 cepas de *Penicillium expansum*, evaluándose la capacidad de producir patulina, resultando todos productores de la toxina en medio de cultivo. Todos los aislamientos produjeron la lesión característica al ser inoculados en manzanas y el 95% produjo patulina en este sustrato. La alta incidencia de especies toxicogénicas de *Alternaria* y de *Penicillium expansum* en uvas de la región patagónica representa un riesgo que debe ser evaluado. No se encontraron cepas del género *Aspergillus*, lo que permitiría inferir que esta región presenta una ventaja competitiva, ya que el riesgo toxicológico atribuible a la presencia de OTA en los vinos estaría muy disminuido y al ser esta la única micotoxina regulada a nivel global, es de interés que los productos de la región cumplan con los estándares internacionales de calidad. La metodología desarrollada en el presente trabajo podría ser aplicada para determinar el potencial riesgo de contaminación con micotoxinas de uvas y subproductos en países de Sudamérica, como el Perú, donde existen escasos datos sobre dicha contaminación.

**Palabras clave:** uvas, *Alternaria*, *Penicillium*, micotoxinas.

## SUMMARY

There is little data on the incidence of toxigenic fungi in grapes grown in South America (Patagonia Argentina). The studies are mainly focused on the identification of potential OTA producing species, main mycotoxin regulated wines worldwide. There are very few data on the incidence of other toxigenic species and their toxins in grapes, juices and wines. The objective of the research was to isolate and identify potentially toxigenic fungi grapes grown in the province of Río Negro, Argentina; and determining the capacity there of toxicogenic. Ten samples of Malbec grapes from the vineyards of the towns of Villa Azul and Maique in Río Negro Province were analyzed; 441 strains of fungi were isolated of which 40.8% belongs to the genus *Penicillium* and 21.8% to the genus *Alternaria*. *Alternaria* and *Penicillium*: identification of a species-group isolates belonging to different genus producing toxins level was performed. 85 isolates belonging to the genus *Alternaria* of which 5 belonged to *A. alternata* species-group, 5 to *A. arborescens* species-group and 75 to *A. tenuissima* species-group were obtained. Likewise, production profiles (AOH, AME and AT) isolates were determined and found to be all produced at least one toxin and 66% produced the three toxins. In turn, 43 strains of *P. expansum* were identified, evaluated the ability of producing patulin, all producers resulting toxin in culture. All isolates produced the characteristic when inoculated into apples and 95% occurred on this substrate injury patulin. The high incidence of toxigenic species *P. expansum* and *Alternaria* in grapes Patagonia represents a risk that must be evaluated. No strains of the genus *Aspergillus* were found, which would allow to infer that this region has a competitive advantage because the toxicological risk attributable to the presence of OTA in wines would be greatly diminished and as this is the only regulated mycotoxin globally, is interest that regional products comply with international quality standards. The methodology developed in this work could be applied to determine the potential risk of mycotoxin contamination grapes and region of products in South America, such as Peru, where there are few data of such contamination.

**Keywords:** grapes, *Alternaria*, *Penicillium*, mycotoxins.

## ABREVIATURAS

<b>ALT:</b>	Altenueno
<b>AME:</b>	Alternariol metil eter
<b>AOH:</b>	Alternariol
<b>AT:</b>	Ácido Tenuazónico
<b>ATX:</b>	Altertoxinas
<b>CYA:</b>	Agar Czapek y extracto de levadura
<b>DG18:</b>	Agar Dicloran 18% Glicerol
<b>G25N:</b>	Agar 25% Glicerol Nitrato
<b>DL<sub>50</sub>:</b>	Dosis letal 50
<b>HPLC:</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>MEA:</b>	Agar Extracto de Levadura
<b>Mha:</b>	Millones de hectáreas
<b>Mhl:</b>	Millones de hectolitros
<b>OIV:</b>	Organización Internacional del Vino y la Viña
<b>OTA:</b>	Ocratoxina A
<b>PDA:</b>	Agar Papa Dextrosa
<b>PDA+C+D:</b>	Agar Papa Dextrosa más antibióticos (Cloranfenicol y Dicloran)
<b>PZA:</b>	Agar Papa Zanahoria
<b>YES:</b>	Agar sacarosa extracto de levadura

# 1. INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos son de suma importancia en lo que se refiere a la producción de agro-alimentos. Pueden colonizar los cultivos, y en condiciones agrometeorológicas favorables para su desarrollo, pueden acumular en los productos infectados gran cantidad de sustancias bioactivas denominadas metabolitos secundarios. Si bien muchos de estos metabolitos pueden resultar beneficiosos, otros, denominados micotoxinas, representan un gran riesgo para la salud humana y animal debido a los efectos adversos que su contacto o ingestión provoca.

Desde el punto de vista de la contaminación de alimentos, las especies más relevantes pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* y *Fusarium*. Particularmente, en lo que a producción agrícola se refiere, los mohos pueden producir micotoxinas en las partes comestibles de las plantas, contaminando directamente productos y subproductos de consumo humano, afectando la salud del consumidor. Refiriéndonos a la producción pecuaria, los alimentos contaminados son la principal fuente para la intoxicación con micotoxinas de ganado, animales de granja y de criaderos. Las micotoxinas llegan a afectar sistemas específicos del organismo pero generalmente dañan el hígado o los riñones por lo que alteran los procesos metabólicos del animal produciendo condiciones adversas que llevan a efectos como hígado pálido, agrandado y friable, inflamación de riñones, lesiones orales, disminución de la respuesta inmunológica, mala absorción de nutrientes, reducción del crecimiento, alteración de la fertilidad, etc. Así, la ingesta oral de metabolitos fúngicos resulta en un impacto negativo sobre todos los parámetros relevantes de la producción animal <sup>1</sup>.

En este aspecto, es de vital importancia conocer las especies fúngicas contaminantes, la capacidad toxicogénica de las mismas, como así también la ocurrencia natural de micotoxinas. Respecto a los mohos y alimentos, la calidad e inocuidad de los productos agroalimentarios no siempre es fácilmente monitoreable y controlable. Una de las evaluaciones más complejas es el eventual riesgo en estos productos de la presencia de contaminación fúngica. Este parámetro una vez conocido permite prevenir el riesgo micotoxicológico en derivados destinados a la alimentación humana y animal como así también mantener y acrecentar la competitividad de este importante sector estratégico.

Así, el objetivo general del presente trabajo fue determinar las poblaciones fúngicas relacionadas a uno de los principales cultivos del Alto Valle de Río Negro. Debido a que la presencia de los hongos toxicogénicos y sus metabolitos tóxicos en los productos de interés agroalimentario es uno de los principales problemas sanitarios y económicos en Sudamérica, es importante el mejoramiento de la calidad y la inocuidad de los productos vegetales, para desarrollar una mayor competitividad de las empresas del sector. Para alcanzar este objetivo es necesario desarrollar metodologías adecuadas para una correcta y rápida identificación de las especies fúngicas, un mejor conocimiento de su variabilidad intraespecífica y de los perfiles de producción de metabolitos secundarios característicos de las poblaciones infectantes. El logro de este objetivo permitirá valorar el riesgo micotoxicológico a que están expuestos los diferentes cultivos, prevenir la difusión de la fitopatías, reducir la ingesta de micotoxinas, prevenir las patologías humanas y animales y desarrollar medidas de prevención y control de hongos toxicogénicos y micotoxinas.

En el Perú se han realizado pocos estudios relacionados a micotoxinas. Se determinó la presencia en productos como café <sup>2</sup>, maca <sup>3</sup>, “paprika” <sup>4</sup>, maíz <sup>5,6</sup> y trucha <sup>7</sup>.

El presente estudio tiene la finalidad de alcanzar los siguientes objetivos:

## **1.1 Objetivo principal**

El objetivo del presente trabajo de tesis fue estudiar la incidencia de hongos toxicogénicos en uvas cultivadas en el valle de Río Negro (Argentina).

## **1.2 Objetivos secundarios**

Se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la capacidad toxicogénica de los aislamientos obtenidos.
- Determinar la patogenicidad y capacidad de producción de toxinas de *Penicillium expansum* en sustrato natural (manzanas).

## 2. GENERALIDADES

### 2.1 Uvas

Taxonómicamente puede clasificarse a la uva (*Vitis vinifera*) de la siguiente manera:

**Reino:** *Plantae*  
**Filum:** *Magnoliophyta*  
**Clase:** *Magnoliopsida*  
**Orden:** *Vitales*  
**Familia:** *Vitaceae*  
**Género:** *Vitis*  
**Especie:** *vinifera*

Según el destino, las uvas (*Vitis vinifera*) pueden clasificarse como:

- a. Uva fresca: El fruto maduro de la vid.
- b. Uva de vinificación: Uva fresca destinada, esencialmente, a la vinificación debido a sus características. Ésta puede estar sobremadurada o ligeramente pasificada o afectada de podredumbre noble, con la condición de que pueda ser estrujada o prensada con los medios comunes de la bodega y que sea capaz de efectuar espontáneamente una fermentación alcohólica.
- c. Uva de mesa: Uva fresca, producida por variedades especiales o cultivadas a este efecto y destinadas, esencialmente, al consumo al natural debido a sus características organolépticas y comerciales.
- d. Uva pasa: Fruto maduro de la vid que, una vez separado de la planta y mediante tratamientos y procesos autorizados, se lleva a un estado de deshidratación o de desecación de manera que no pueda ser estrujado por los medios comunes de la bodega, ni fermentar espontáneamente. Debido a sus características se destina a usos alimenticios excepto a la elaboración de vino y de zumo de uva. Ésta es producida por variedades especiales o cultivadas a este efecto <sup>8</sup>.

### 2.1.1 Producción mundial de uvas

Desde 1995, la superficie mundial de viñedos ha disminuido en un 4% de 7802 a 7475 Mha (Fig. N°1). La producción mundial de vino se ha incrementado de manera significativa en el 2013: 281 Mhl, este valor podría interpretarse como relativamente alto dada la reciente reducción de las superficies de los viñedos. Los principales países productores de vino son Italia (45 Mhl), Francia (44 Mhl), España (40 Mhl), EEUU (22 Mhl) y Argentina (15 Mhl), esto representa un aumento significativo de 2, 7, 23, 7 y 27% respectivamente en comparación con la producción del 2012 (Fig. N°2) <sup>9</sup>.



Fig. N°1: Evolución de la superficie mundial de viñedos <sup>9</sup>.

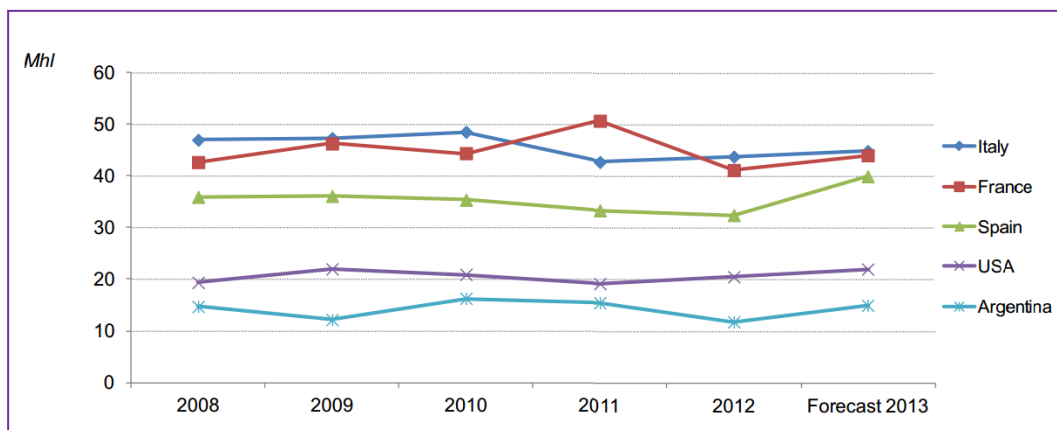


Fig. N°2: Principales países productores de vino a nivel mundial <sup>9</sup>.



### 2.1.2 Producción de uvas en Argentina

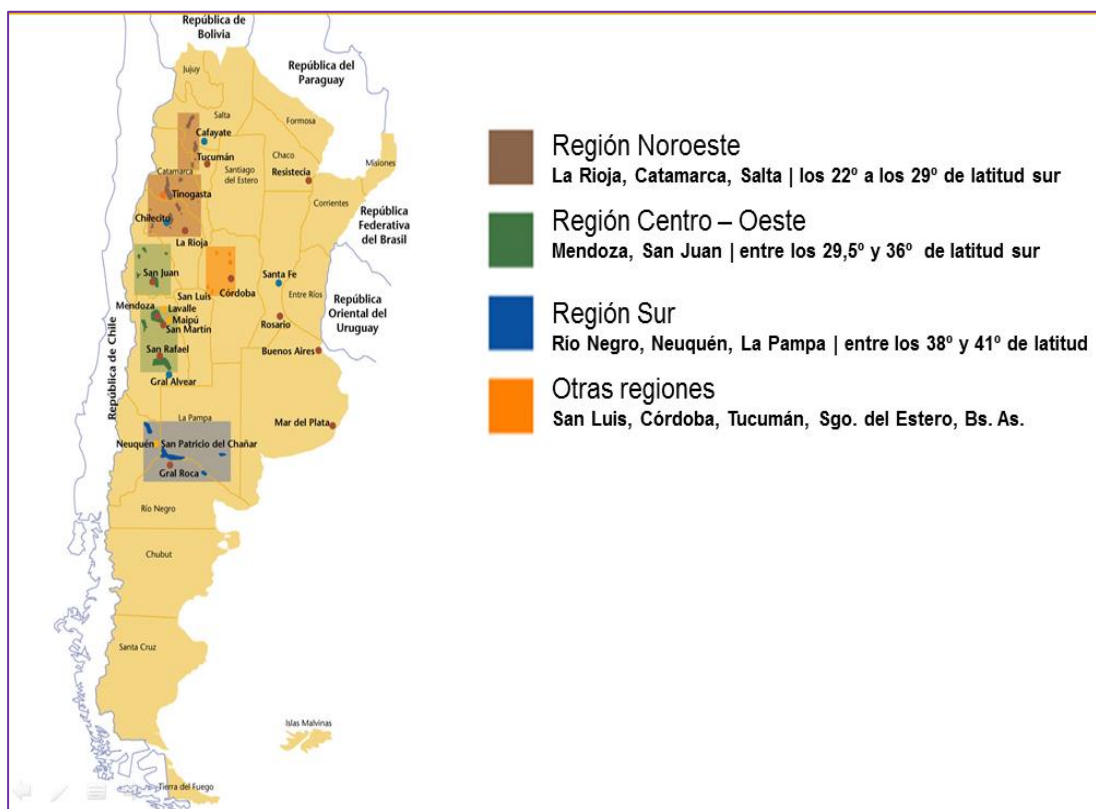
La producción de uvas en Argentina se remonta al año 1551 con la introducción de las primeras *Vitis vinifera* a ese país. Los primeros viñedos se implantaron en las provincias de Mendoza y San Juan; transformando así tierras áridas en verdes y extensos oasis. Siendo favorecidos con las óptimas condiciones climáticas y de suelo; y el aporte de los inmigrantes europeos conocedores de las técnicas vitivinícolas <sup>10</sup>.

El área plantada de vid en viñedos de Argentina fue de 224 mil hectáreas en el 2013; y la producción de vino en este mismo periodo retornó de acuerdo con su potencial (15 Mhl en comparación con 11,8 Mhl el año pasado, que es de 27% más) <sup>11</sup>. Siendo considerado el quinto productor a nivel mundial. A su vez exportó 324.1 millones de litros de vino ubicándose como décimo primer exportador a nivel mundial <sup>9</sup>.

La producción total de uvas fue de 28.717.487,30 quintales en el 2013, concentrando Mendoza casi el 70%, seguida por San Juan con el 25%, entre las principales provincias. La vinificación constituye el principal destino de la vid, se destina el 97% de la superficie plantada, seguido del consumo en fresco y pasas, respectivamente (Ver Anexo 3 - Fig. N°1).

Las regiones vitivinícolas argentinas abarcan las provincias de Salta, Catamarca, La Rioja, San Juan, Mendoza, Neuquén, Río Negro, San Luis, Córdoba, Tucumán, Santiago del Estero y Buenos Aires (Fig. N°3).

La Región vitivinícola sur comprende las provincias de Río Negro, Neuquén, La Pampa y Chubut en la Patagonia Argentina. La producción de uvas de esta región se destina íntegramente a vinificación y alcanzó el 0,92% del total del país, la provincia Neuquén con el 63% fue la producción más significativa de la cosecha 2013, sigue en importancia Río Negro con el 30% <sup>12</sup> (Ver Anexo 3 - Fig. N°2).



**Fig. Nº3:** Regiones vitivinícolas argentinas <sup>13</sup>.

La producción de uvas en la provincia de Río Negro durante el 2013 fue de 80.08 quintales métricos (0.28% de la producción total), se localiza principalmente en el Departamento de General Roca (93% de la producción), seguido de los Departamentos de Adolfo Alsina (4%), Avellaneda (2.2%) y El Cuy (1.1%) <sup>14</sup>.

En el presente estudio, se tomaron muestras del Valle Maiqué, en el Departamento de General Roca, y el Valle Azul del Departamento de El Cuy.

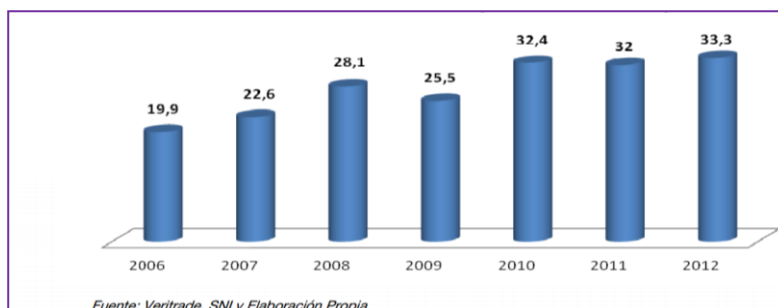
### 2.1.3 Producción de uvas en el Perú

La industria vitivinícola tiene una larga historia en el Perú, ya que fue introducida por los conquistadores españoles hace más de cuatro siglos empujados por las condiciones relativamente favorables del país para la viticultura <sup>15</sup>.

En diciembre 2013, la producción de uva registró 84 mil 602 toneladas de uvas y logró un crecimiento de 19,8% en relación a lo informado en diciembre 2012, debido al clima favorable que permitió el buen desarrollo del cultivo <sup>16</sup>. Las zonas productoras de uva en el Perú se encuentran ubicadas principalmente en la costa sur y corresponden a Lima, Ica, Arequipa, Moquegua y Tacna; cuya temporada de cosecha se efectúa entre los meses de noviembre y febrero. En la costa norte la zona de producción de uva se encuentra en la región de La Libertad <sup>17</sup>. Sin embargo, las regiones que presentaron una mayor producción en el 2013, fueron: Piura (104,1%) y Cajamarca (12,7%). Se determinó decrecimiento en las regiones de Lambayeque (-2,3%), Arequipa (-60,4%), Moquegua (-56,9%), Lima (-42,0%), San Martín (-35,8%), La Libertad (-6,2%) e Ica (-3,3%) en comparación con el 2012 <sup>16</sup> (Ver Anexo 3 - Fig. N°3).

En el Perú, los destinos de la producción de uvas son la elaboración de Pisco (49%), seguido de uva de mesa (27%), vinificación (15%) y consumo familiar (9%) <sup>17</sup> (Ver Anexo 3 - Fig. N°4).

Con respecto a la producción de vinos, se observa una suave tendencia creciente de la producción local, con una brusca interrupción en el 2009 (atribuible al impacto en el Perú de la crisis internacional), un estancamiento en el año 2011 y un ligero crecimiento en 2012. (Fig. N°4). El consumo de vino *per cápita* alcanza todavía cifras muy bajas, situándose alrededor de 1,40 litros por persona y año <sup>15</sup>.



**Fig. N°4:** Producción vitícola del Perú (millones de litros) <sup>15</sup>.

## 2.2 Hongos y micotoxinas

### 2.2.1 Micobiota de uvas

Las uvas tienen una compleja ecología microbiana incluyendo hongos filamentosos, levaduras y bacterias con diferentes características fisiológicas y efectos sobre la producción del vino. Algunas especies sólo se encuentran en las uvas, como hongos parásitos y bacterias ambientales, mientras que otras tienen la capacidad de sobrevivir y crecer en vinos, que constituyen el consorcio microbiano del vino. La proporción de estos microorganismos depende de la etapa de maduración de la uva y de la disponibilidad de nutrientes <sup>18</sup>. Los hongos pueden ser patógenos, infectan las raíces, el tronco, las hojas y las bayas de las uvas <sup>19</sup>.

#### 2.2.1.1 Registros de micobiota de uvas a nivel mundial

Existen múltiples estudios donde se detallan las principales especies fúngicas en bayas de uvas y productos derivados.

Se caracterizaron morfológica y molecularmente 7 cepas representativas de *Alternaria* spp. asociadas a la podredumbre de uva destinadas a pasas en la zona vitivinícola Valpolicella (Italia) <sup>20</sup>.

En Asia, se identificaron siete géneros de hongos contaminantes: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Fusarium* en uvas de viñedos chinos. Los géneros más frecuentes, en orden decreciente, fueron *Aspergillus*, *Penicillium* y *Mucor*. El género *Alternaria* fue principalmente aislado de bayas de uva intactas, pero rara vez de las bayas podridas <sup>21</sup>.

En tres regiones vitivinícolas de Eslovaquia se analizó la micobiota relacionada a uvas en el período de envero, maduración y vendimia. Se aislaron hongos no toxicogénicos responsables de podredumbre en uvas que puede afectar las propiedades del vino, en mayor proporción en el periodo de envero: *Plasmopara*, *Uncinula*, *Botrytis*, *Coniella*, *Guinardia*, *Elsinoë* y *Saccharomycetes* spp. En relación a los hongos toxigénicos; se

aislaron 93 cepas (2008) y 57 cepas (2009) de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* y *Fusarium*<sup>22</sup>.

De las uvas de vinificación de Europa e Israel, fueron aisladas 441 cepas de *Aspergillus* y 101 cepas de *Penicillium* para el análisis de micotoxinas<sup>23</sup>.

En otro estudio, se analizaron uvas de Hungría y República Checa (25 viñedos). Se aislaron 16 cepas de *Aspergillus niger*. Del mismo modo, se aislaron otros hongos potencialmente toxigénicos incluyendo *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum* y *Alternaria* spp.<sup>24</sup>.

En Portugal, se identificaron 27 géneros fúngicos de 11 viñedos, los más frecuentes fueron: *Alternaria*, *Botrytis* y *Cladosporium* que representan el 16, 17 y 24% respectivamente; otros hongos fueron *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus niger*, *Epicoccum nigrum*, *Penicillium brevicompactum*, *P. thomii* y *Rhizopus*. Los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* representaron el 15 y 24% respectivamente, estos géneros varían significativamente según el origen geográfico<sup>25</sup>.

Se determinó que la microbiota predominante de 4 viñedos españoles pertenecía a *Aspergillus* spp., seguido por *Alternaria* spp., *Penicillium* spp. y *Cladosporium* spp., representando el 79,7%, 13,4%, 8% y el 4,4% de las bayas respectivamente<sup>26</sup>.

Durante el 2002 y 2003, en España, la micoflora aislada a partir de uvas incluyó, en orden decreciente: *Alternaria*, levaduras, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Epicoccum*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Phoma*, *Trichoderma* y *Ulocladium*<sup>27</sup>.

En Australia, se estudiaron tres cosechas de uvas frescas y pasas; se aislaron comúnmente *Aspergillus aculeatus*, *A. carbonarius* y *A. niger*<sup>28</sup>.

### 2.2.1.2 Registros de micobiota de uvas a nivel sudamericano

En Sudamérica, existen pocos estudios relacionados a la determinación de micoflora de uvas destinadas a vinificación.

Se caracterizaron mediante métodos moleculares poblaciones de *Aspergillus sección Nigri* aislados de siete regiones productoras de uvas de Argentina <sup>29</sup>. Se aislaron 284 cepas de este hongo de uvas de vinificación de 8 regiones productoras de vinos de la Argentina <sup>30</sup>.

Se analizaron cepas de *Aspergillus niger* aislados de pasas de uvas, maní y café de Argentina; en relación a factores ecofisiológicos <sup>31</sup>.

*Penicillium* spp. se aisló consistentemente en muestras de uva de mesa poscosecha en Chile, de diferentes variedades, durante la temporada 2004-2005. Del mismo modo, se detectó este hongo en uvas Thompson Seedless aparentemente sanas en el viñedo durante el crecimiento <sup>32</sup>.

Se aislaron de pasas de uvas en Argentina, los géneros fúngicos: *Aspergillus* (50,2%), *Eurotium* (21,4%) y *Penicillium* (13,5%). La especie más comúnmente aislada fue *Aspergillus niger* <sup>33</sup>.

Para el análisis del efecto de fungicidas en pre y poscosecha; se aislaron considerablemente *Penicillium expansum* de uvas de mesa en Chile, siendo responsables de la podredumbre azul que afecta a las uvas <sup>34</sup>.

De uvas cosechadas en Argentina, se obtuvieron siete géneros de hongos filamentosos; entre ellos *Alternaria* spp. (80%) y *Aspergillus* spp. (70%) fueron los más frecuentes, otros géneros fueron: *Cladosporium* spp. y *Penicillium* spp. <sup>35</sup>.

En un estudio realizado en uvas de Argentina y Brasil se determinaron como principales géneros fúngicos contaminantes *Aspergillus*, *Penicillium* y *Botrytis*. Otros géneros identificados, en orden decreciente, fueron: *Phytophthora*, *Moniliella*, *Alternaria* y *Cladosporium* <sup>36</sup>.

### 2.2.2 Micotoxinas

Los hongos toxicogénicos pueden colonizar los cultivos y en condiciones agrometeorológicas favorables para su desarrollo causan enormes pérdidas económicas debido al deterioro de los vegetales tanto en las etapas de precosecha como de poscosecha y almacenamiento. Pueden además, acumular en los productos infectados gran cantidad de sustancias bioactivas denominadas metabolitos secundarios. Dichos metabolitos no son esenciales para el crecimiento y reproducción del organismo que los sintetiza. Cada especie fúngica posee un perfil de metabolitos secundarios que le es propio. Si bien muchos de estos metabolitos pueden resultar beneficiosos, otros, denominados micotoxinas, representan un gran riesgo para la salud humana y animal debido a los efectos adversos que su contacto o ingestión provoca.

Desde el punto de vista de la contaminación de alimentos, las especies más relevantes pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* y *Fusarium*. Algunos de ellos causan deterioro de alimentos típicamente durante el almacenamiento (*Aspergillus* y *Penicillium*), otros (*Alternaria* y *Fusarium*) son patógenos de plantas, generalmente con especificidad de huésped, causando la contaminación y consecuente acumulación de toxina en la etapa de precosecha.

Algunas micotoxinas se destacan por su elevada toxicidad, como es el caso de las aflatoxinas que se encuentran entre los hepatocancerígenos naturales más potentes conocidos hasta ahora, otras pueden afectar el riñón (ocratoxina A, citrinina), el sistema nervioso (patulina, tremógenos), o el aparato reproductor (zearalenona). Algunas presentan efectos tóxicos múltiples en el hombre y en los animales (tricotecenos) o están muy probablemente asociadas a la alta incidencia de cáncer de esófago en ciertas poblaciones (fumonisinas). En algunos casos, se ha detectado la co-ocurrencia de diversos metabolitos tóxicos, ya sea por la presencia de más de una especie toxicogénica o de alguna especie capaz de biosintetizar más de una toxina, las cuales pueden actuar sinérgicamente <sup>1</sup>.

#### 2.2.2.1 Micotoxinas en uvas

La preocupación por los hongos filamentosos en la viña tradicionalmente se ha relacionado con el deterioro de uvas debido al crecimiento de los mismos. El principal responsable de la podredumbre de la uva es *Botrytis cinerea*, un patógeno que daña las bayas y tiene un efecto perjudicial sobre las propiedades organolépticas. Sin embargo, otros hongos saprobióticos pueden causar la pudrición en las uvas y, además, producir micotoxinas. Dos géneros principales son responsables de la producción de micotoxinas en las uvas: *Aspergillus* y *Penicillium*.

Debido a que la producción de micotoxinas es característica de la especie, la identificación de las especies fúngicas presentes en las uvas puede predecir los peligros potenciales de micotoxinas<sup>25</sup>.

En general, la micoflora de las uvas se compone de especies no productoras de las principales micotoxinas. Sin embargo, existen registros de bajas frecuencias de micotoxinas como aflatoxina, OTA, patulina y tricotecenos aisladas de las bayas aparentemente sanas<sup>37</sup>.

#### 2.2.2.2 Registros de micotoxinas a nivel mundial

##### 2.2.2.2.1 Uvas

De los 7 géneros identificados en Asia (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Fusarium*) en uvas sanas y dañadas de viñedos, se determinó que 16 aislamientos eran capaces de producir OTA, (12 *Aspergillus* spp., 3 *Penicillium* spp., y un *Cladosporium* spp.); 17 aislados, produjeron patulina (4 *Aspergillus* spp. y 13 *Penicillium* spp.); y 3 aislamientos de *Aspergillus* spp. tuvieron evidencia de producción de aflatoxina B1<sup>21</sup>.

Se determinó que en uvas de Europa e Israel, de los 101 aislamientos de *Penicillium* 5 produjeron patulina (3 *P. expansum* y 2 *P. griseofulvum*) y 8 produjeron citrinina (5 *P. expansum*, 2 *P. citrinum* y 1 de *P. verrucosum*); y de los 441 aislamientos de *Aspergillus* ninguno produjo patulina ni citrinina<sup>23</sup>.

En otro estudio, se analizó la producción de OTA de la microbiota de uvas de Hungría (35 muestras) y República Checa (22 muestras). Se determinó en uvas de Hungría



que 10 cepas de *Aspergillus niger* produjeron OTA en pequeñas cantidades (1,5 a 10mg/kg) <sup>24</sup>.

En cuatro viñedos españoles se determinó que el 98,5% de los aislamientos de *A. carbonarius* fueron capaces de producir OTA. Se consideró que este hongo es la fuente más importante de OTA en vinos, siendo su presencia aumentada con la maduración de las uvas <sup>26</sup>.

El análisis de la producción de OTA, en uvas de España, demostró que uniseriados no producen OTA, que un bajo porcentaje de los aislamientos de *A. niger agregado* son ocratoxigénicos (2-7%), y que en mayor proporción *A. carbonarius* fue productor de OTA (78 - 100%) <sup>38</sup>.

En Portugal se estudió la micobiota y la capacidad ocratoxigénica en uvas de vinificación. Se determinó que el 8% de la micobiota aislada eran especies micotoxigénicas; de aflatoxinas (0,3%), OTA (6,0%), patulina (0,5%) y tricotecenos (1,2%). Se evaluó la capacidad del género *Aspergillus* para producir OTA; siendo el 4% de *A. niger agregado* ocratoxigénico. Se determinó que *A. carbonarius* fue predominante en comparación de *A. alliaceus* y *A. niger agregado* <sup>37</sup>.

En Australia se analizó la producción de OTA en uvas frescas y pasas, se determinó que todos los aislamientos de *A. carbonarius* eran ocratoxigénicos, y que ningún aislamiento de *A. aculeatus* o *A. niger* producía OTA <sup>28</sup>.

#### **2.2.2.2.2 Vinos y mostos**

Se analizó la presencia de OTA en diferentes tipos de vinos minoristas (blanco, rosa y tinto), seco o dulce, de Grecia. Se comprobó que 47 de 55 vinos secos (blancos, tintos y rosados) y 5 de 5 vinos dulces (blanco y rojo) estuvieron contaminados con OTA. El nivel de infección en 55 muestras estuvo por debajo del límite de la UE (2ng/mL), mientras que en 5 muestras se superó dicho límite. Los vinos más contaminados fueron los secos de la región de Tesalia (de 0,04 hasta 2,52ng/mL) <sup>39</sup>.

En 27 vinos japoneses e importados (14 tintos y 13 blancos) se analizó la presencia de 14 micotoxinas (patulina, deoxinivalenol, las aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1, toxina T-2, toxina HT-2, la zearalenona, las fumonisinas B1, B2, B3 y la ocratoxina A). Se

detectó fumonisinas en varios vinos en niveles menores que los límites de cuantificación (1mg/L); el mayor valor de OTA fue de 0,20mg/L pero esto es menor de su nivel máximo establecido por la Unión Europea <sup>40</sup>.

Se analizaron 30 vinos tintos importados de Reino Unido, Alemania, Suiza y Estados Unidos. La concentración media de OTA de los vinos analizados fue de 0.077mg/L, siendo este nivel insignificante. Se observó mayor concentración de OTA en los vinos de las regiones europeas vitícolas meridionales <sup>41</sup>.

En Alemania se analizaron 96 muestras de mostos de diferentes calidades y tipos de uva. Se determinó que todos los mostos de la variedad Scheurebe contenían patulina, seguidos de las variedades Riesling y Borgoña; la mayor concentración de patulina (80mg/l) se determinó en racimos Scheurebe, seguido de Silvaner con 57,4mg/L <sup>42</sup>.

En otro estudio, se analizó la producción de OTA en zumos de uva, mosto y vino de Hungría y República Checa. No se detectó OTA en ninguna muestra <sup>24</sup>.

Un estudio adicional analizó la presencia de OTA en 24 vinos de África del Sur e Italia (15 blancos y 9 tintos), se presentó una media de 0,16 ug/L en los vinos blancos y una media de 0,24 ug/L en los vinos tintos. Aunque la contaminación de OTA estaba presente en todas las muestras de Sudáfrica analizadas, los niveles eran muy por debajo del sugerido. De los ocho vinos italianos analizados, sólo dos vinos tintos estaban contaminados por encima del nivel máximo sugerido <sup>43</sup>.

### **2.2.2.3 Registros de micotoxinas a nivel sudamericano**

#### **2.2.2.3.1 Uvas**

Cuando se analizó la presencia natural de OTA en pasas de uvas argentinas se concluyó que el 60% de las pasas estaban contaminadas con OTA, con niveles de 0,26 a 20,28ng/g <sup>44</sup>.

Fue analizado el potencial ocratoxigénico de aislamientos de *Aspergillus* sección *Nigri* de ocho regiones vitivinícolas de la Argentina; 32% de las cepas (91/284) eran productoras de OTA, en un rango de 5 - 1.285ng/g de CYA; de estas 91 cepas, 63 (69%) fueron identificadas como *A. niger* agregado y 28 (31%) como *A. carbonarius*. Especies uniseriadas de todas las regiones no fueron productores de OTA. Se

observaron diferencias en la capacidad toxigénica de las cepas aisladas de diferentes regiones <sup>30</sup>.

De la micobiota aislada en pasas de uva en Argentina, se determinó que *Aspergillus niger* fue la especie más comúnmente aislada, pero solo 3 de 293 aislamientos resultaron productores de OTA. *Aspergillus carbonarius* fue aislado en una menor proporción pero el 96% de los 48 aislamientos resultó productor de OTA <sup>33</sup>.

En uvas argentinas, se determinó que 26 cepas de 63 *Aspergillus sección Nigri* fueron productores de OTA en un rango de 2 a 24.5ng/mL de medio YES <sup>35</sup>.

El análisis de uvas de vino en Argentina y Brasil demostró que el 17% de 48 cepas de *A. niger* aisladas de uvas argentinas, produjeron OTA en el rango de 32 a 77µg/mL. En uvas de Brasil, *A. niger*, *A. carbonarius* y *A. ochraceus* fueron ocratoxigénicos, en el rango de 18 a 2900mg/mL <sup>36</sup>.

#### **2.2.2.3.2 Vinos y mostos**

En Brasil se analizó la presencia de OTA en 80 vinos de cosecha del 2002 al 2008; de un total de 43 vinos nacionales y 37 importados de Argentina (32) y Chile (5). De los vinos nacionales, 25 (31,3%) fueron positivos, presentando niveles de OTA superiores a 0.020ng/mL de OTA; y 58,1% de las muestras estaban contaminadas, con niveles que van desde 0,020 hasta 0,050 ng/mL de OTA. No se detectó en los vinos importados <sup>45</sup>.

Un estudio que comprendió el análisis de OTA en 1188 vinos chilenos (663 vinos directamente de las bodegas; 380 vinos con Denominación de Origen (DO) y 145 vinos sin DO fueron adquiridos en mercado) reflejó en general la baja incidencia de OTA en los vinos producidos en Chile, pero se observó que la incidencia de OTA en el vino tinto es el doble que en el vino blanco <sup>46</sup>.

Cuando se analizó la presencia natural de OTA en los mostos y vinos argentinos se encontró baja incidencia con bajos niveles de contaminación media por OTA (0,12ng/mL y 0,37ng/mL, respectivamente) <sup>44</sup>.

El análisis de vinos y jugos de uva producidos en Argentina, Brasil y Chile demostró que estos contenían muy bajos niveles de OTA <sup>47</sup>. En un estudio donde se analizaron 68 vinos de Argentina y Chile no se detectó OTA en ninguno de los vinos analizados<sup>48</sup>.

En São Paulo se analizó la presencia de OTA en vinos y zumos de uva. Se observó la presencia de OTA en 9 de 29 vinos tintos brasileños con niveles que van desde 0,10 hasta 1,33ng/mL; y en 18 de los 34 vinos tintos importados con niveles que van 0,03-0,32ng/L. No se detectó OTA en ninguna de las 38 muestras de jugo de uva analizadas. Los valores de OTA detectados se encontraron por debajo de los límites establecidos (2,0ng/mL) <sup>49</sup>.

## 2.3 Género *Alternaria*

El género *Alternaria* incluye especies patógenas que se encuentran en una gran variedad de plantas agrónomicamente importantes tales como cereales, cultivos oleaginosos, verduras y frutas <sup>50</sup>.

Una gran diversidad de cepas de *Alternaria* ha sido aislada de diversos huéspedes vegetales incluidas las uvas <sup>51-54</sup>. Especies del género *Alternaria* contaminan cereales, frutas y verduras, causando enfermedades como el corazón mohoso en manzanas y la podredumbre negra en tomates, con las consiguientes pérdidas económicas y los riesgos para la salud humana y animal por la acumulación de toxinas en los alimentos.

### 2.3.1 Taxonomía

El género *Alternaria* fue establecido por Nees <sup>55</sup> y clasificado taxonómicamente de la siguiente manera:

**Reino: Fungi.**

**Filum: Deuteromycetes.**

**Clase: Hyphomycetes.**

**Orden: Hyphomycetales.**

**Familia: Dematiaceae.**

**Género: *Alternaria***



**Fig. N°5:** *Alternaria* spp.

Emory Simmons <sup>56</sup> revisó la taxonomía de *Alternaria* y organizó el género en 276 especies basándose en las características de los conidios y formación de las cadenas, en tres dimensiones. Desarrolló el concepto de grupo especie haciendo referencia a una especie representativa, por ejemplo, los grupo especie *A. infectoria*, *A. brassicicola*, *A. radicina*, *A. tenuissima* o *A. alternata*. Las ventajas de su uso son que organiza a nivel sub-género el conjunto morfológicamente diverso de *Alternaria* spp. y permite la discusión generalizada de especies morfológicamente similares. Este concepto ha sido especialmente valioso entre las especies de esporas pequeñas que representan los casos más difíciles en términos de diagnósticos precisos, debido a sus complejos patrones de esporulación tridimensionales.

Las principales características que determinan el patrón de esporulación son la longitud de los conidióforos primarios, los patrones de ramificación, la presencia, la duración y el origen de los conidióforos secundarios, ángulos de ramificación, el grado de encadenamiento, tamaños y formas de los conidios, etc.

### **2.3.2 Identificación**

Considerando sus características típicas; en PDA, *Alternaria* exhibe colonias que varían de color blanco grisáceo a verde negruzco, dependiendo de las especies, pero es común para todos que se alcancen diámetros entre 60 a 70mm en una semana, presentando en todos los casos desarrollo de micelio afelpado <sup>57</sup>.

Los conidios de *Alternaria* poseen septos transversales y longitudinales y se los conoce como dictiosporas, además son pardos y picudos. Nacen por la brotación apical de una célula conidiógena o de la espora anterior, dando lugar en este último caso a una cadena, que suele ramificarse si una espora produce más de un brote <sup>58</sup>.

A continuación, se presentan los modelos de esporulación y la descripción de cada grupo-especie <sup>56</sup> (Fig. N° 10):

#### 2.3.2.1 Grupo-especie *A. tenuissima*:

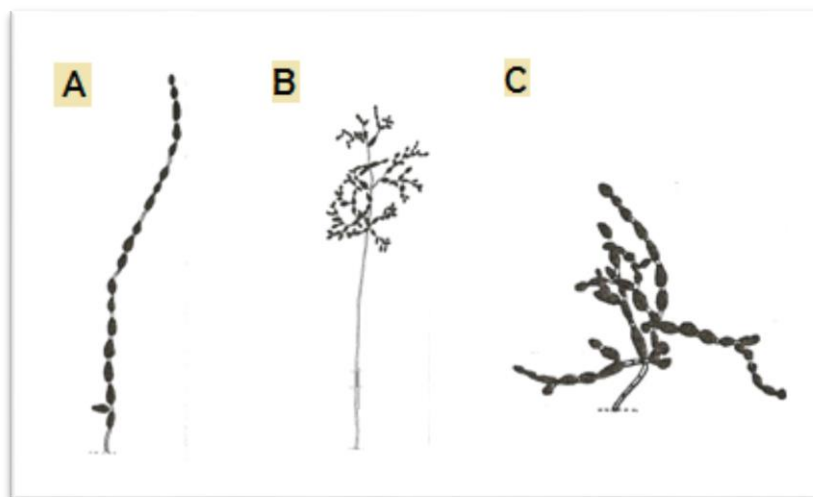
El grupo-especie *A. tenuissima* se caracteriza por presentar cadenas de longitud moderada a larga, de entre 10-15 (-20) conidios; sin ramificaciones, o muy pocas. Los conidios aparecen algo delgados a 50x y usualmente pierden “robustez”.

#### 2.3.2.2 Grupo-especie *A. arborescens*:

El grupo-especie *A. arborescens* se caracteriza por presentar agrupaciones arborescentes, compactas o abiertas de cadenas ramificadas de longitud corta a moderada. El conspicuo conidióforo primario de tal “formación tipo árbol” es oscuro, de corto a algunas veces muy largo y que asciende directamente del sustrato o desde una ramificación hifal, esporulando primeramente cerca del ápice.

#### 2.3.2.3 Grupo-especie *A. alternata*:

El grupo-especie *A. alternata* se caracteriza por presentar conidióforo primario corto que lleva un grupo de ramificación o cadenas no ramificadas de 5-15 conidios pequeños. La ramificación de las cadenas se origina tanto desde el alargamiento de los conidióforos secundarios o después de la formación de conidios terminales.

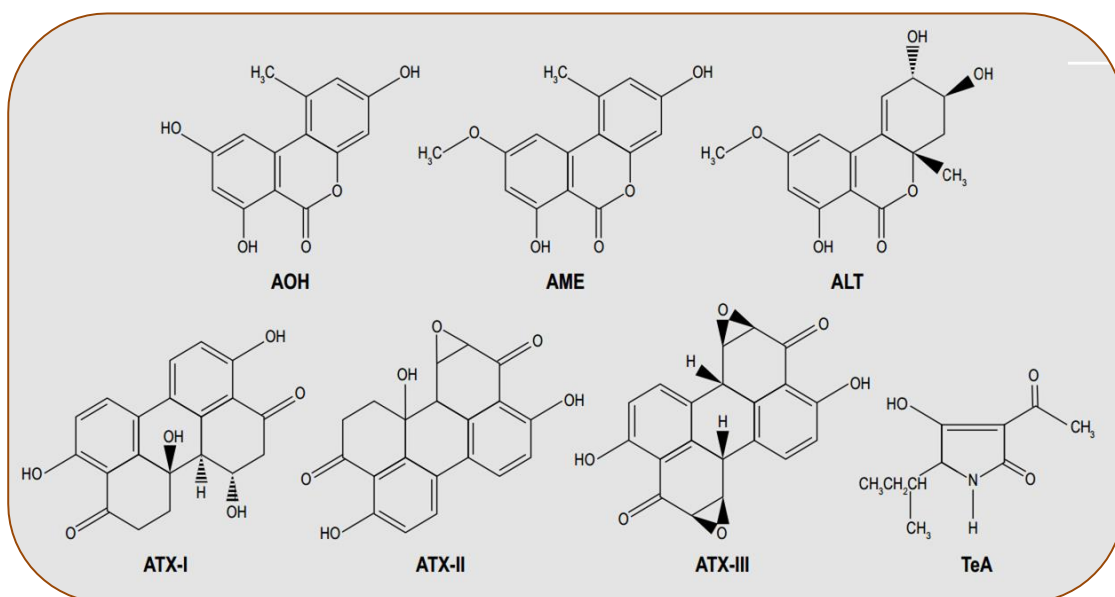


**Fig. N°6:** Modelos de esporulación de los grupo-especie:  
A) *A. tenuissima*. B) *A. arborescens*. C) *A. alternata*<sup>56</sup>.

### 2.3.3 Toxinas

El género produce 71 micotoxinas y fitotoxinas. Las principales micotoxinas de *Alternaria* pertenecen a tres clases estructurales <sup>59</sup>:

- **Ácido tetrámico:** Ácido Tenuazónico (AT).
- **Los derivados de la dibenzopirona:** Alternariol (AOH), Alternariol Metileter (AME) y Altenueno (ALT).
- **Los derivados de perilenequinonas:** Altertoxinas(ATX).



**Fig. N°7:** Estructura química de AOH, AME, ALT, ATX-I, ALT-II, ATX-III y AT (TeA) <sup>60</sup>.

Dentro de las toxinas más comunes producidas por el género se encuentran el Alternariol, el Alternariol Metiléter y el Ácido Tenuazónico. Todas estas toxinas han sido detectadas en el medio ambiente como contaminantes naturales en diversas áreas del mundo, inclusive en Argentina <sup>61,62</sup> y han estado implicadas en enfermedades humanas y animales.

La toxicidad del AT ha sido reportada en las plantas, en embriones de pollo y varias otras especies de animales, entre ellos los conejillos de indias, ratones, conejos, perros y monos rhesus. AOH y AME son mutagénicos y citotóxicos para las células bacterianas y de mamíferos, y se sospecha que son cancerígenos. Tanto AOH y AME causan toxicidad aguda débilmente y muestran efectos sinérgicos. AT es más tóxico que AOH, AME y ALT <sup>60, 63-65</sup>.

No existen hasta el presente regulaciones para estas micotoxinas y son necesarios mayores estudios a nivel global para determinar los límites permitidos en alimentos <sup>65</sup>.

Al evaluar la toxicidad de AT, su DL50 reportada es de 125mg/Kg para ratón y alrededor de 50mg/Kg para mono. En el caso de los alternarios (AME y AOH) su DL50 reportada es de 400mg/Kg de peso corporal para ratón <sup>66</sup>.

#### 2.3.4 Patologías importantes producidas por *Alternaria*

En las uvas, este hongo causa la podredumbre del racimo, daña las bayas, raspón y pedicelos <sup>67,68</sup>. Especies como *Alternaria alternata*, *Alternaria arborescens* y *Alternaria tenuissima* se han aislado con frecuencia de la uva durante su desarrollo en el viñedo o del almacenamiento poscosecha <sup>20,25,33,52</sup>.

En uvas de mesa infectadas con *A. alternata* y almacenadas en frío, se demostró que este patógeno es capaz de penetrar en el tejido del huésped a través de los estomas, lenticelas y microfisuras de la epidermis <sup>67</sup>.

En general, *Alternaria* spp. es menos agresiva que *Botrytis cinerea* en frutos sanos, sin embargo a través de la invasión de hifas, ambos tipos de hongos son favorecidos sobre otros que pudren la fruta, tales como *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. <sup>67</sup>

La invasión de hifas es frecuente en los procesos posteriores a la cosecha de uvas que las hacen más susceptibles a la infección por el moho. Uno de estos procesos poscosecha implica la deshidratación de uvas para producir vinos especiales tales como vinos de pasas de uva (por ejemplo, Amarone, Recioto y Vin Santo).



**Fig. N°8:** Diversos niveles de lesión en uvas de mesa, producidas por *Alternaria* spp. según el grado de patogenicidad <sup>20</sup>.



## 2.4 Género *Penicillium*

El género *Penicillium* es muy diverso, en términos de número de especies y de hábitats. La mayoría de las especies de *Penicillium* se consideran ubicuos, saprofitos y oportunistas. Nutricionalmente, son poco exigentes, siendo capaces de crecer en casi cualquier entorno con un puñado de sales minerales, pero ninguna de las formas más complejas de carbono orgánico, y en una amplia gama de entornos físico-químicos, es decir,  $a_w$ , temperatura, pH y potencial redox. La mayoría de las especies descritas son hongos del suelo, y su presencia en los alimentos es más o menos accidental. Sin embargo, se ha hecho evidente en los últimos años que un buen número de especies están estrechamente relacionadas con los alimentos. En particular, muchas especies de *Penicillium* parecen tener su hábitat natural primario en los granos de cereales. Algunas especies son más especializadas, varias son patógenos destructivos en frutas (por ejemplo, *P. digitatum*, *P. expansum*, *P. italicum*), unos pocos crecen por debajo de 0.80  $a_w$  (por ejemplo, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. implicatum*), a baja tensión de oxígeno (por ejemplo, *P. roqueforti*) o son resistentes a los conservantes (*P. roqueforti*). Muchos son psicrótrofos y capaces de causar deterioro de los alimentos a bajas temperaturas <sup>50</sup>.

### 2.4.1 Taxonomía

El género *Penicillium* fue descrito por primera vez por Link en 1809 y se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera:

**Reino: *Fungi*.**

**Filum: *Ascomycota*.**

**Clase: *Euascomycetes*.**

**Orden: *Eurotiales*.**

**Familia: *Trichocomaceae*.**

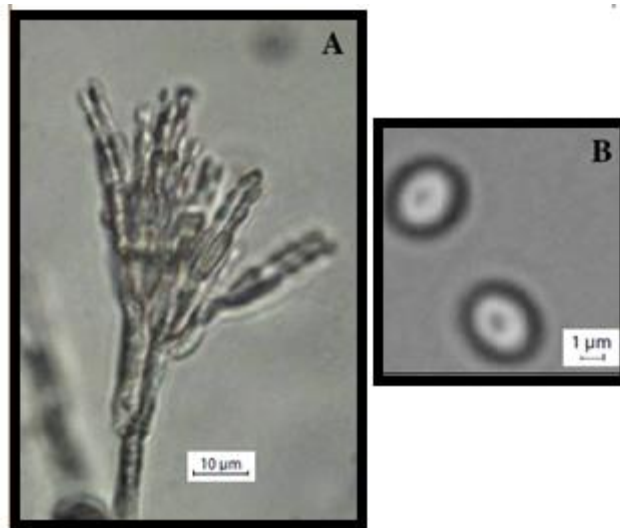
**Género: *Penicillium*.**

Según Pitt y Hocking <sup>50</sup>; el género *Penicillium* presenta 4 subgéneros: *Aspergilloides*, *Penicillium*, *Biverticillium* y *Furcatum*.

## 2.4.2 Identificación

### 1.4.2.1 *P. expansum*

Las colonias de *P. expansum* macroscópicamente en CYA miden entre 30 y 40mm de diámetro y presentan una o más bandas anulares, con áreas adyacentes velutinosas a flocosas; micelio blanco; conidios producidos en cantidades moderadas, verde opaco. Las colonias en MEA son variables, de 20 a 40mm de diámetro. En G25N de 17 a 22mm de diámetro. No crecen a 37°C y a 5°C solo se desarrollan microcolonias ocasionales. Al microscopio, son típicamente terverticilados, con conidios elipsoidales, fialides estrechamente compactas y ampuliformes <sup>50</sup>.



**Fig. N°9:** *Penicillium expansum*. A) Conióforos terverticilados. B) Conidios elipsoidales. Barra conidóforo = 10µm. Barra conidios = 1µm.

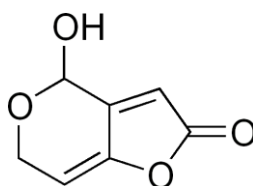
## 2.4.3 Toxinas

El género *Penicillium* contiene un gran número de especies toxigénicas, la capacidad de este género para producir diferentes micotoxinas es superior a la existente en cualquier otro género fúngico. Las principales micotoxinas producidas por *Penicillium* se muestran en la Tabla N°1

Micotoxina	Subgénero	Principales especies productoras
Ácido ciclopiazónico	<i>Penicillium</i>	<i>P. camemberti</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. griseofulvum</i>
Ácido penicílico (AP)	<i>Penicillium</i>	<i>P. aurantiogriseum</i> , <i>P. viridicatum</i>
	<i>Furcatum</i>	<i>P. simplicissimum</i> <sup>a</sup>
Citrinina (CIT)	<i>Penicillium</i>	<i>P. expansum</i> , <i>P. verrucosum</i>
	<i>Furcatum</i>	<i>P. citrinum</i>
Ocratoxina A (OA)	<i>Penicillium</i>	<i>P. verrucosum</i> , <i>P. nordicum</i> <sup>b</sup>
Patulina	<i>Penicillium</i>	<i>P. expansum</i> , <i>P. griseofulvum</i>
Penitrems	<i>Penicillium</i>	<i>P. crustosum</i> , <i>P. glandicola</i> <sup>c</sup>
	<i>Furcatum</i>	<i>P. canescens</i> <sup>a</sup> , <i>P. janczewskii</i> <sup>ac</sup>
Roquefortina C	<i>Penicillium</i>	<i>P. chrysogenum</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. expansum</i>
		<i>P. griseofulvum</i> , <i>P. hirsutum</i> , <i>P. hordei</i>
		<i>P. roqueforti</i>
<b>Toxina PR</b>	<i>Penicillium</i>	<i>P. roqueforti</i>

**Tabla N°1:** Principales micotoxinas producidas por *Penicillium* spp. <sup>69</sup>.

Patulina es una toxina producida por especies de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Byssoschlamys*. Esta toxina causa efectos neurotóxicos, mutagénicos, teratogénicos e inmunotóxicos en animales, por lo que su presencia en los jugos de fruta debe ser controlada. Dentro de la industria elaboradora de jugos de manzana y uva la presencia de patulina en los mismos es motivo de preocupación, siendo importante evaluar si los niveles de patulina, pueden ser eficientemente manejados mediante procedimientos poscosecha integrados en un efectivo programa sanitario <sup>70</sup>.



**Fig. N°10:** Estructura química de patulina.

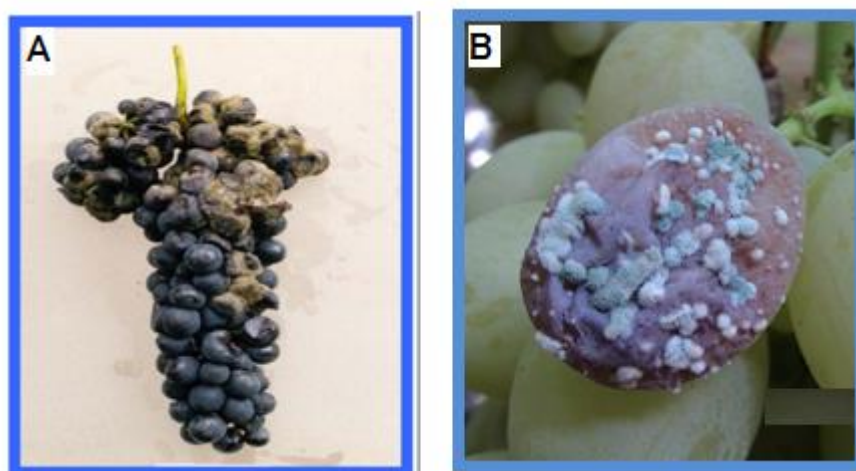
La legislación centra su atención en manzanas, sus derivados y alimentación infantil. En el Perú esta toxina no se encuentra regulada. En cuanto a su DL<sub>50</sub> en ratas es de 15 y 25 mg/kg si es inyectada de forma subcutánea. La muerte de las ratas se debe a

edema pulmonar. Un estudio sobre los efectos combinados de la patulina en la reproducción, la toxicidad a largo plazo y la carcinogenicidad señaló una ingesta sin consecuencias nocivas de 43µg/kg de peso corporal al día. Sobre la base de este trabajo y utilizando un factor de seguridad de 100, el JECFA estableció, con carácter provisional, una ingesta diaria máxima tolerable de 0,4 µg/kg de peso corporal <sup>71</sup>.

#### 2.4.4 Patologías en uvas

Se conoce que *Penicillium expansum* es el responsable de la podredumbre verde azul en uvas que se caracterizan por el desarrollo de una pudrición blanda, acuosa, de color pardo claro, la que eventualmente compromete al fruto en su totalidad. En la superficie aparece primero un moho blanco que luego se torna verde-azulado. Produce coremios en la superficie de frutas mantenidas en frío. Es posible que los racimos sean superficialmente contaminados durante la cosecha aportando el inóculo necesario para infecciones en poscosecha <sup>34,72</sup>.

*P.expansum* tiene la capacidad de crecer y deteriorar uvas conservadas en frío (0°C) por más de 30 días. En los últimos años, el gran volumen de uvas producido ha obligado a prolongar la conservación en frío por más de 60 días. Tal circunstancia favorece el desarrollo de la podredumbre azul lo que limita considerablemente la comercialización de la uva de mesa, reduciendo su valor comercial en los mercados de destino <sup>32</sup>.



**Fig. N°11:** Podredumbre de los racimos causada por *Penicillium* spp. <sup>73</sup>.

### **3. MATERIALES**

#### **3.1 Materiales de vidrio y otros**

- Aguja estéril
- Algodón
- Arroz estéril
- Asa de Kolle
- Bagueta de vidrio
- Balones de vidrio
- Bandejas de plástico y acero
- Bolsas plásticas
- Cinta adhesiva
- Embudos de vidrio
- Gradillas
- Manzanas variedad Deliciosa
- Micropipetas HTL® de 0.20 y 1mL
- Microtubos con tapa rosca de 1.8mL
- Erlenmeyer de 125, 250, 500mL; 1, 2 y 3L
- Papel filtro
- Parafilm® Lámina de cierre
- Pera de decantación de 125 y 250mL
- Pinzas de acero
- Placas de Petri de vidrio 100 x 15 mm
- Placas de Petri de plástico estériles 90 x 15 mm
- Porta y cubreobjetos
- Regla
- Soporte universal
- Tips estériles
- Tiras indicadoras de pH
- Tubos de ensayo de vidrio de 15x150 y 13x100 mm
- Vaso de precipitación o Beaker de 100mL y 250mL
- Viales de vidrio de 4mL

### 3.2 Equipos

- Agitador orbital analógico KS 260, IKA®, Velocidad de 10 a 500 min<sup>-1</sup>
- Autoclave a gas VZ® a 121°C
- Balanza analítica Precisa 205A SWISSQUALITY® 600gx0.1g
- Baño de agua a 45°C Copreva® de acero inoxidable
- Bomba de vacío DIMARCO, motor a inducción CZERWENY®
- Cámara de Flujo Laminar, PREGLIASCO S.R.L. modelo 810714
- Cabina de Bioseguridad II-A/P TELSTAR®
- Centrífuga Sorvall Instruments RC5C Refrigerated a 25°C
- Columna analítica C<sub>18</sub> Júpiter 250 x 4.6mm x 5µm
- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Shimadzu® SCL-6B con detector UV
- Estufa de esterilización ELIBET® modelo TC6003P a 170°C
- Incubadora SANYO® a 25°C
- Incubadora SANYO® a 37°C
- Incubadora SANYO® a 25°C adaptada a ciclos de luz
- Lavador ultrasónico TESTLAB® potencia ultrasónica 80w
- Microscopio estereoscópico ARCANO® 4 y 8x
- Microscopio binocular ZEISS-AXIOSTAR® 10, 40 y 100x
- Quemador de asa de Kolle, HORNOS ELECTRICOS S.A ® a 800°C
- Refrigeradora CONVENTRI a 5°C
- Rotavapor BUCHI® R 110 a 40°C
- Vórtex Thermolyne® amplitud de agitación 6.2mm

### 3.3 Reactivos, solventes y estándares

- Acetato de etilo
- Acetonitrilo para análisis y calidad HPLC
- Ácido acético
- Ácido fórmico
- AOH estándar marca sigma
- AME estándar marca sigma
- AT estándar marca sigma
- Ácido clorhídrico
- Agua destilada

- Alcohol 96°
- Bicarbonato de sodio ac. (5%)
- Carbonato de sodio
- Cloroformo
- Hexano
- Hipoclorito de sodio
- Metanol para análisis y calidad HPLC
- Nitrógeno, estado gaseoso
- Patulina estándar marca sigma
- Sulfato de amonio ac. (20%)
- Tween 80
- $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

### **3.4 Medios de cultivo**

- Agar Czapek y Extracto de Levadura (CYA)
- Agar Dicloran 18% Glicerol (DG18)
- Agar 25% Glicerol Nitrato (G25N)
- Agar Extracto de Levadura (MEA)
- Agar Papa Dextrosa (PDA)
- Agar Papa Dextrosa más antibióticos (PDA+C+D)
- Agar Papa Zanahoria (PZA)
- Agar sacarosa extracto de levadura (YES)

## 4. MÉTODOS

### 4.1 Muestreo

Se recolectaron racimos de uvas de la variedad Malbec destinadas a la elaboración de vinos pertenecientes a la cosechas 2013, provistas por los productores. Se seleccionaron 10 muestras de viñedos de las localidades de Valle Azul y Maiqué, provincia de Río Negro, en la Patagonia Argentina. Los racimos se colocaron en bolsas plásticas, y fueron trasladados al Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires cuidando la cadena de frío (se mantuvieron a 4 °C) hasta el momento de su análisis. Algunas muestras presentaron un evidente grado de deterioro (Ver Anexo 3 - Fig. N°5).

En la tabla N°2 se detallan las muestras obtenidas, la variedad de uva y las localidades de donde los frutos han provenido (Ver Anexo 3 - Fig. N°6-7).

MUESTRA	VARIEDAD	LOCALIDAD
VAM 1	Malbec	Valle Azul
VAM 2	Malbec	Valle Azul
VAM 3	Malbec	Valle Azul
VAM 4	Malbec	Valle Azul
VAM 5	Malbec	Valle Azul
VAM 6	Malbec	Valle Azul
VAM 7	Malbec	Valle Azul
VAM 8	Malbec	Valle Azul
RM 1	Malbec	Valle Maiqué
RM 2	Malbec	Valle Maiqué



**Tabla N°2:** Muestreo. Se detalla la localidad de origen de las muestras.

## 4.2 Aislamiento y Conservación

### 4.2.1 Aislamiento

#### ❖ Aislamiento de hongos

- a. Desinfección: las uvas fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al 5%, durante 1 minuto, luego se enjuagaron en agua destilada.
- b. Siembra: en una cámara de flujo laminar; se colocaron 50 uvas de cada muestra en forma aséptica, a razón de 5 uvas por placa Petri, en dos medios de cultivo (Ver anexo 1): PDA+C+D y DG18.
- c. Incubación: en una estufa regulada a 25°C durante 7 días.

Con el objetivo de obtener cultivos puros, sin contaminación y listos para su identificación de los diferentes géneros fúngicos, cada colonia de ambos medios de cultivo (PDA+C+D y DG18) fue reaislada por inoculación de pequeños trozos de micelios o esporas en placas de PDA. Se constató la pureza de las colonias por la apariencia uniforme de las mismas, al ser incubadas a 25°C durante 7 días.

### 4.2.2 Conservación

#### 4.2.2.1 *Alternaria*

Los aislamientos de *Alternaria* se conservaron en microtubos estériles que contenían 1mL de agua destilada. De las placas de PZA de cada cultivo, se cortaron cuadrados de agar, los cuales se sumergieron en 1mL de agua destilada estéril, y se colocaron en refrigeración a 4°C hasta su análisis (Ver Anexo 3 - Fig. N°8 A).

#### 4.2.2.2 *Penicillium*

La conservación de los aislamientos de *Penicillium* se realizó en tubos de ensayo que contenían PDA inclinado, se aseguró la tapa con Parafilm®. Se conservaron los aislamientos en refrigeración a 4°C hasta su posterior análisis (Ver Anexo 3 - Fig. N°8 B).

## 4.3 Identificación

Se realizó la identificación de los diferentes aislamientos pertenecientes a los géneros productores de toxinas: *Alternaria* y *Penicillium*. Todos los aislamientos pertenecientes al género *Alternaria* fueron identificadas a nivel grupo–especie. De los 180 aislamientos pertenecientes al género *Penicillium*, se identificaron 43 *Penicillium expansum*.

### 4.3.1 *Alternaria*

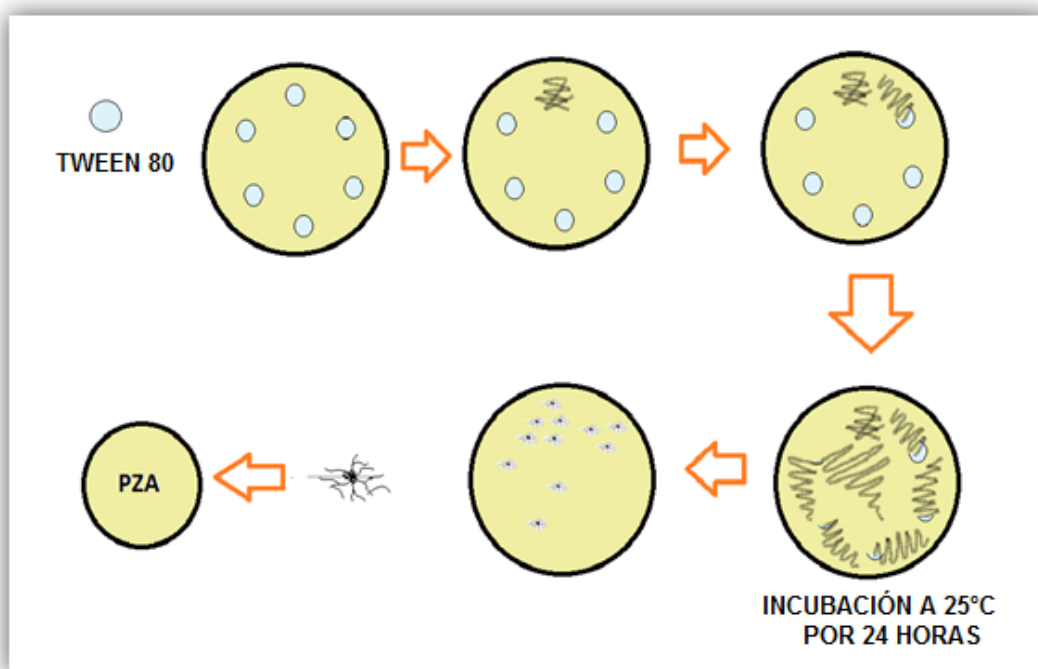
En el caso de *Alternaria*, las colonias sospechosas, que poseían las características diferenciales del género como color oscuro y reverso negro, se observaron al microscopio para la confirmación del género por la presencia de dictiosporas.

Los cultivos fueron reaislados por inoculación de pequeños trozos de micelios o esporas a placas de Agar Papa Zanahoria (PZA) e incubados a 25°C durante 7 días, en ciclos alternantes de luz-oscuridad (8 horas de luz y 16 horas de oscuridad).

Con el fin de asegurarnos que el cultivo fuese puro, se realizó un cultivo monospórico, el cual es un reaislamiento de una sola espora de *Alternaria*<sup>50</sup> (Ver Anexo 3 -Fig. N°9).

#### ❖ Técnica de “Cultivo monospórico” (Fig. N°12)

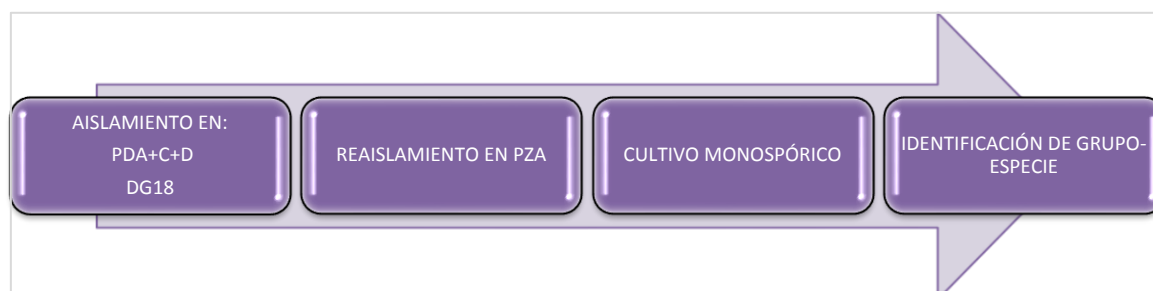
- a. En PZA se colocaron seis gotas de solución Tween 80 al 0.05%.
- b. Se tomaron conidios con el asa, los cuales se descargaron en una de las gotas de Tween 80 y se hicieron estrías anchas en la zona cerca a la gota inicial. En cada gota restante, se realizaron estrías siguiendo una misma dirección.
- c. Se Incubaron a 25°C durante 24 horas.
- d. Se examinó con lupa estereoscópica (4x) la presencia de esporas aisladas germinadas.
- e. Se tomó un cuadrado pequeño con solo una espora característica. Y se sembró en una placa de PZA. Se incubó a 25°C durante 7 días, en ciclos alternantes de luz-oscuridad.



**Fig. N°12:** Esquema del procedimiento para obtener cultivos monospóricos de *Alternaria* (Elaboración propia).

A partir de los cultivos monospóricos se procedió a la determinación del grupo-especie de cada aislamiento. Se realizaron observaciones microscópicas de los cultivos sobre PZA según Simmons <sup>56</sup>.

Hasta aquí se siguió el procedimiento experimental esquematizado en la Fig. N°13.



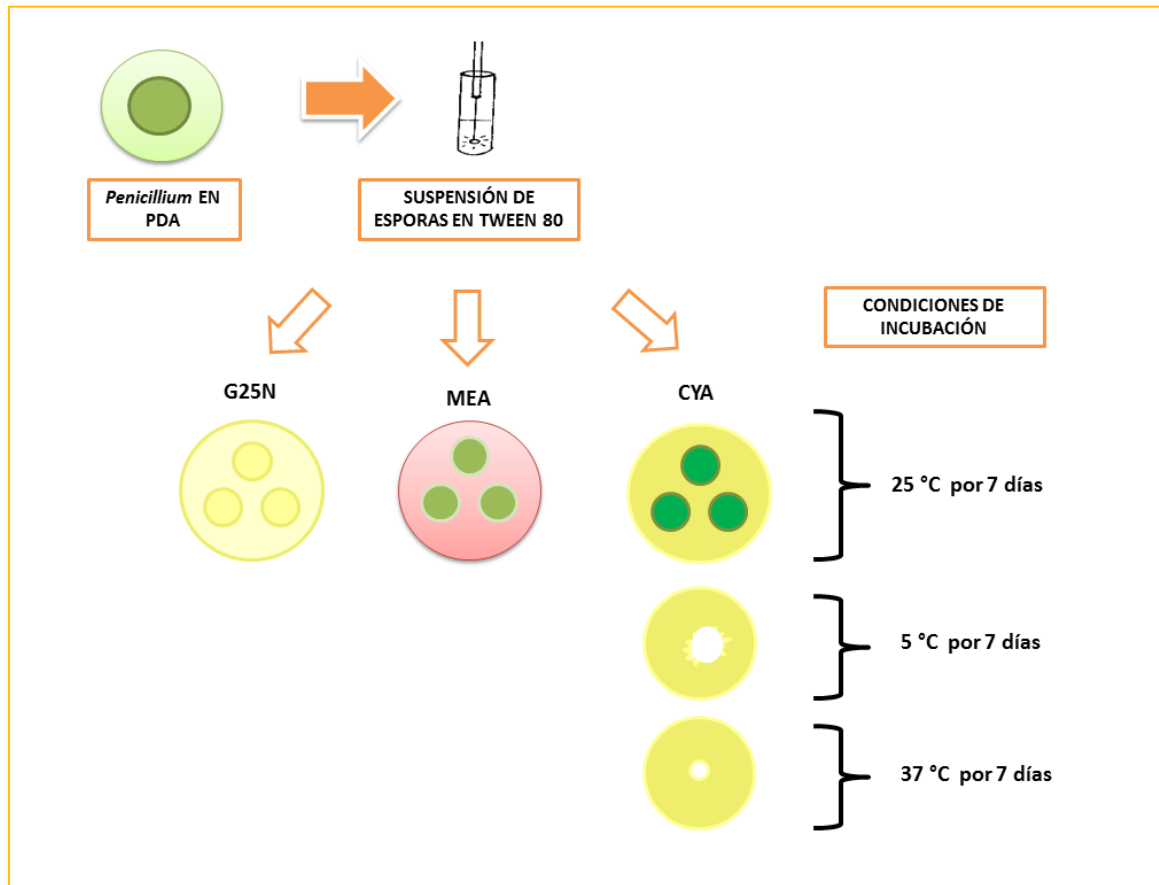
**Fig. N°13:** Procedimiento experimental seguido para identificar los aislamientos de *Alternaria*.

#### 4.3.2 *Penicillium*

En este género, las colonias sospechosas de características macroscópicas diferenciales como color verde, se observaron al microscopio para la confirmación del género por la presencia de conidióforos característicos.

Se identificaron 43 aislamientos de *Penicillium expansum*, para su posterior análisis<sup>50,57,74</sup>.

- ❖ Procedimiento de identificación de *Penicillium* a nivel especie (Fig. N°14):
  - a. Desde un cultivo fresco, de 7 días de incubación, se suspenden esporas en 3mL Tween 80 al 0.05%.
  - b. Se siembra cada muestra realizando 3 puntos en los medios de cultivo (Ver Anexo 1):
    - Agar Czapek Extracto de levadura (CYA): 3placas
    - Agar Extracto de levadura (MEA): 1 placa
    - Agar 25% Glicerol Nitrato (G25N): 1 placa
  - c. Se incuban a 25°C por 7 días, una placa de cada medio. Las dos placas restantes de CYA, se incuban a 5°C y 37°C durante 7 días.
  - d. Se observan las características macro y microscópicamente para la determinación de la especie *P. expansum*.



**Fig. N°14:** Esquema del procedimiento de siembra en los medios de identificación de *Penicillium* (Elaboración propia).

#### **4.4 Determinación de la capacidad toxicogénica de los aislamientos de *Alternaria* para la producción de las micotoxinas más comunes (AOH, AME, AT)**

De los 85 aislamientos del género *Alternaria*, se analizaron las capacidades toxicogénicas de 50 aislamientos pertenecientes a los grupos-especie: *A. alternata* 5 (10%), *A. arborescens* 5 (10%), *A. tenuissima* 40 (80%).

##### **4.4.1 Producción de toxinas**

La producción de toxinas se llevó a cabo sobre arroz autoclavado. Se pesaron 12.5g de arroz contenido en erlenmeyers de 120 mL que fueron llevados a una humedad del 45% y luego autoclavados a 121°C por 20 min.

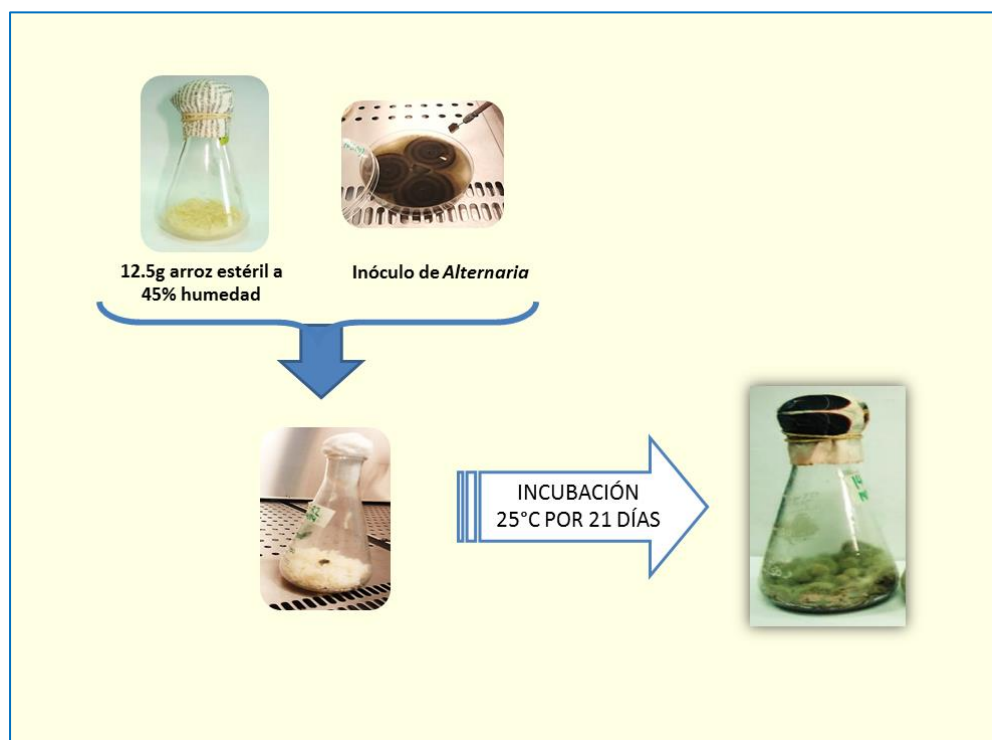
De las colonias desarrolladas durante 7 días en PZA, se obtuvo con un asa aguja un cuadrado de la parte media de la colonia y se depositó en el centro del erlenmeyer que contenía el arroz autoclavado. Los cultivos se incubaron a 25°C durante 21 días en oscuridad <sup>75</sup>. (Fig. N°15)

##### **4.4.2 Extracción de toxinas**

Al culminar los 21 días de incubación se procedió a la extracción de las toxinas según el método detallado por Li *et al.* <sup>75</sup>. (Ver Anexo 3 - Fig. N°10).

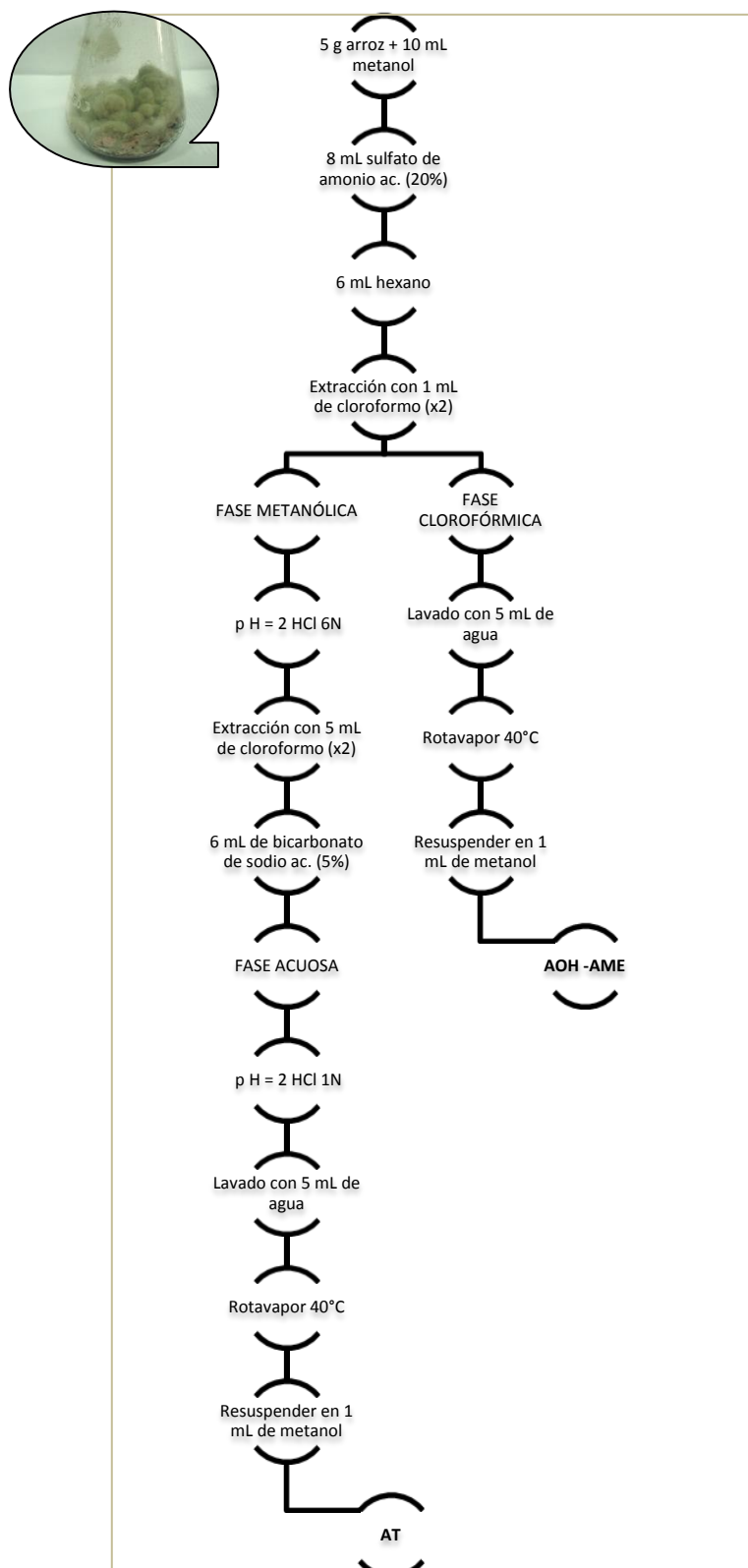
- ❖ Procedimiento de extracción de las toxinas AOH, AME, AT (Ver procedimiento esquematizado en Fig. N°16)
  - a. Extraer 5 g del cultivo con 10mL de metanol.
  - b. Agregar 8mL de sulfato de amonio acuoso al 20%. Agitar y filtrar.
  - c. Agregar 6mL de hexano, recogiendo en pera de decantación la fase acuosa.
  - d. Extraer dos veces la fase colectada con 1mL de cloroformo para obtener AOH y AME.
  - e. Evaporar a sequedad a 40°C en rotavapor la fase clorofórmica que contiene AOH y AME. Reconstituir en 1mL de metanol calidad HPLC.

- f. Acidificar ( $\text{pH} = 2$ ) con  $\text{HCl}$  6N la fase metanólica que contiene AT, y extraer dos veces con 5mL de cloroformo.
- g. Agregar 6mL de bicarbonato de sodio acuoso (5%), agitar y descartar la fase clorofórmica.
- h. Reconstituir el AT a su forma ácida ajustando a  $\text{pH}$  2 con  $\text{HCl}$  6 N
- i. Extraer dos veces con 3mL de cloroformo.
- j. Recoger ambos extractos clorofórmicos en pera de decantación y lavar con 5mL de agua.
- k. Evaporar a sequedad a  $40^\circ\text{C}$  en rotavapor. Reconstituir en 1mL de metanol calidad HPLC.



**Fig. N°15:** Siembra del inóculo en medio arroz para la producción de micotoxinas (Elaboración propia).





**Fig. N°16:** Procedimiento para la extracción de AOH, AME y AT (Elaboración propia).

#### **4.4.3 Análisis de toxinas**

Los extractos obtenidos fueron analizados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Se utilizó un cromatógrafo Shimadzu LC-CA (Shimadzu, Kyoto, Japón) equipado con una válvula Rheodyne con un loop de 20µl y un detector UV Shimadzu modelo SPD-6A (Ver Anexo 3 - Fig. N°11 A). La columna analítica fue C<sub>18</sub> marca Júpiter 250 x 4,6mm x 5µm (Phenomenex, USA).

#### **4.4.4 Sistema de solventes y detección**

La fase móvil utilizada para el análisis de AT consistió en metanol:agua (90:10) con 300mg por litro de ZnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O. En el caso de las toxinas AOH y AME, la fase móvil consistió en metanol:agua (80:20) con 300mg por litro de ZnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O.

Se llevó a cabo la corrida cromatográfica con un flujo de 0,4mL/min. En la detección se emplearon las longitudes de onda de 258nm para AOH y AME, y 280nm para AT.

#### **4.4.5 Determinación cuantitativa de las toxinas extraídas**

Se utilizó una curva de calibración para determinar la concentración de toxinas de cada extracto. La curva fue elaborada con soluciones estándares de cada toxina correlacionando el área de los picos con la masa de analito inyectada. Se co-inyectó el estándar para confirmar la identidad de los picos correspondientes a cada extracto.

Los límites de detección determinados fueron 5µg/kg para AOH, 2µg/kg para AME y 11µg/kg para AT.

Los estándares de toxinas utilizados fueron de la marca Sigma.

## 4.5 Determinación de la capacidad toxicogénica de los aislamientos de *Penicillium expansum*.

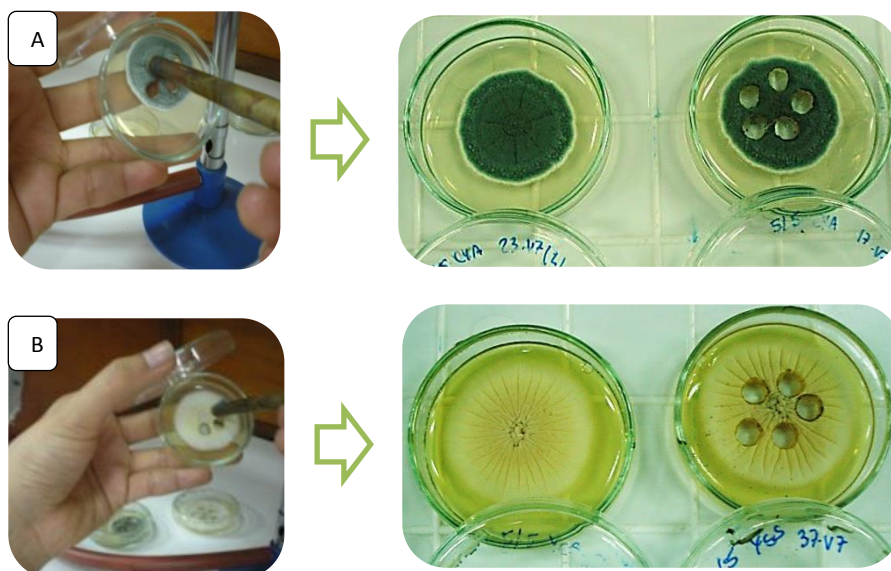
De los 180 aislamientos correspondientes al género *Penicillium* se determinó la capacidad de producir patulina de 43 aislamientos identificados como *Penicillium expansum*, a partir de pequeños cilindros de agar “plugs” de CYA y YES<sup>76</sup>.

### 4.5.1 Producción de toxinas

A partir de las colonias desarrolladas durante 7 días en tubos de PDA, se preparó una suspensión de esporas en Tween 80 al 0.05%, la cual se sembró en los medios CYA y YES. Los cultivos fueron incubados a 25 °C durante 7 días.

### 4.5.2 Extracción de toxinas

De los cultivos de *Penicillium expansum*, se cortaron 5 pequeños cilindros de agar de 2mm de diámetro de ambos medios (CYA y YES), y fueron colocados en un vial limpio de 4mL (Fig. N°17).



**Fig. N°17:** Forma de obtener los 5 pequeños cilindros de agar. A) Del medio CYA. B) Del medio YES.

Se agregó 2mL de acetato de etilo:ácido fórmico (200:1, v/v); y los pequeños cilindros de agar fueron sonicados durante una hora (Ver Anexo 3 - Fig. N°11 B). Los extractos fueron transferidos a un vial limpio y evaporados bajo corriente de nitrógeno hasta sequedad. Luego los extractos fueron reconstituidos en 1mL de metanol y filtrados para su posterior análisis.

#### **4.5.3 Análisis de toxinas**

Los extractos obtenidos fueron analizados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Se utilizó un cromatógrafo Shimadzu LC-CA (Shimadzu, Kyoto, Japón) equipado con una válvula Rheodyne con un loop de 20µl y un detector UV Shimadzu modelo SPD-6A. La columna analítica fue C<sub>18</sub> marca Júpiter 250 x 4,6mm x 5µm (Phenomenex, USA).

#### **4.5.4 Sistema de solventes y detección**

Para el análisis de patulina se utilizó una fase móvil constituida por agua:acetonitrilo (90:10). La corrida cromatográfica se llevó a cabo a un flujo de 1mL/min. La longitud de onda empleada para la detección fue 276nm.

#### **4.5.5 Determinación de toxinas extraídas**

La determinación de la concentración de toxina de cada extracto fue llevada a cabo a partir de curvas de calibración realizadas con soluciones estándar de patulina correlacionando el área del pico vs la masa del analito. La identidad de los picos fue confirmada mediante la co-inyección con el correspondiente estándar.

El límite de detección determinado fue 0.1µg/kg para patulina.

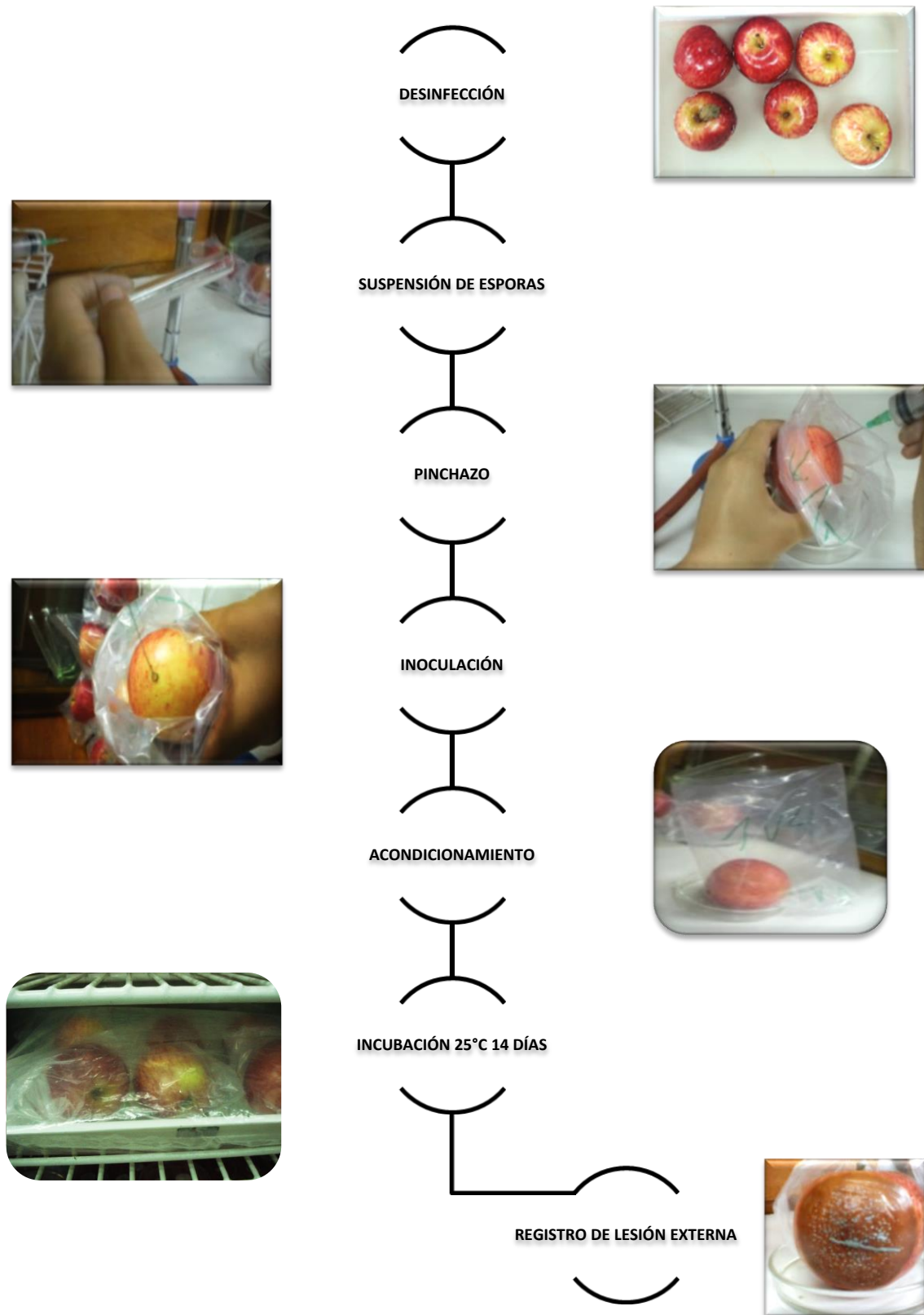
El estándar de toxina utilizado fue de la marca Sigma.

#### **4.6 Determinación de la patogenicidad de los aislamientos de *Penicillium expansum***

Para este ensayo fueron evaluados 43 aislamientos correspondientes a *Penicillium expansum*. La patogenicidad fue determinada en manzanas de tipo Deliciosa, en las cuales producen una lesión característica, siguiendo el procedimiento:

❖ **PROCEDIMIENTO** (ver Fig. N°18)

- a. Las manzanas fueron desinfectadas superficialmente; se sumergieron durante 10 minutos en una solución agua : hipoclorito de sodio (20:1).
- b. Desde los aislamientos frescos (7 días de incubación) de *Penicillium expansum* se preparó una suspensión de esporas en una solución de 3mL de Tween 80 al 0.05% de  $10^5$  -  $10^6$  esporas / mL.
- c. Cada manzana fue pinchada con una aguja estéril hasta 2mm debajo la piel y fueron inoculadas con una gota de la suspensión de esporas con un ansa calibrada (2 $\mu$ l).
- d. Las manzanas fueron colocadas individualmente en bolsas plásticas transparentes impermeables al agua y permeables al oxígeno e incubadas a 25°C.
- e. Se midió el diámetro de la lesión a los 7 y 14 días de incubación.



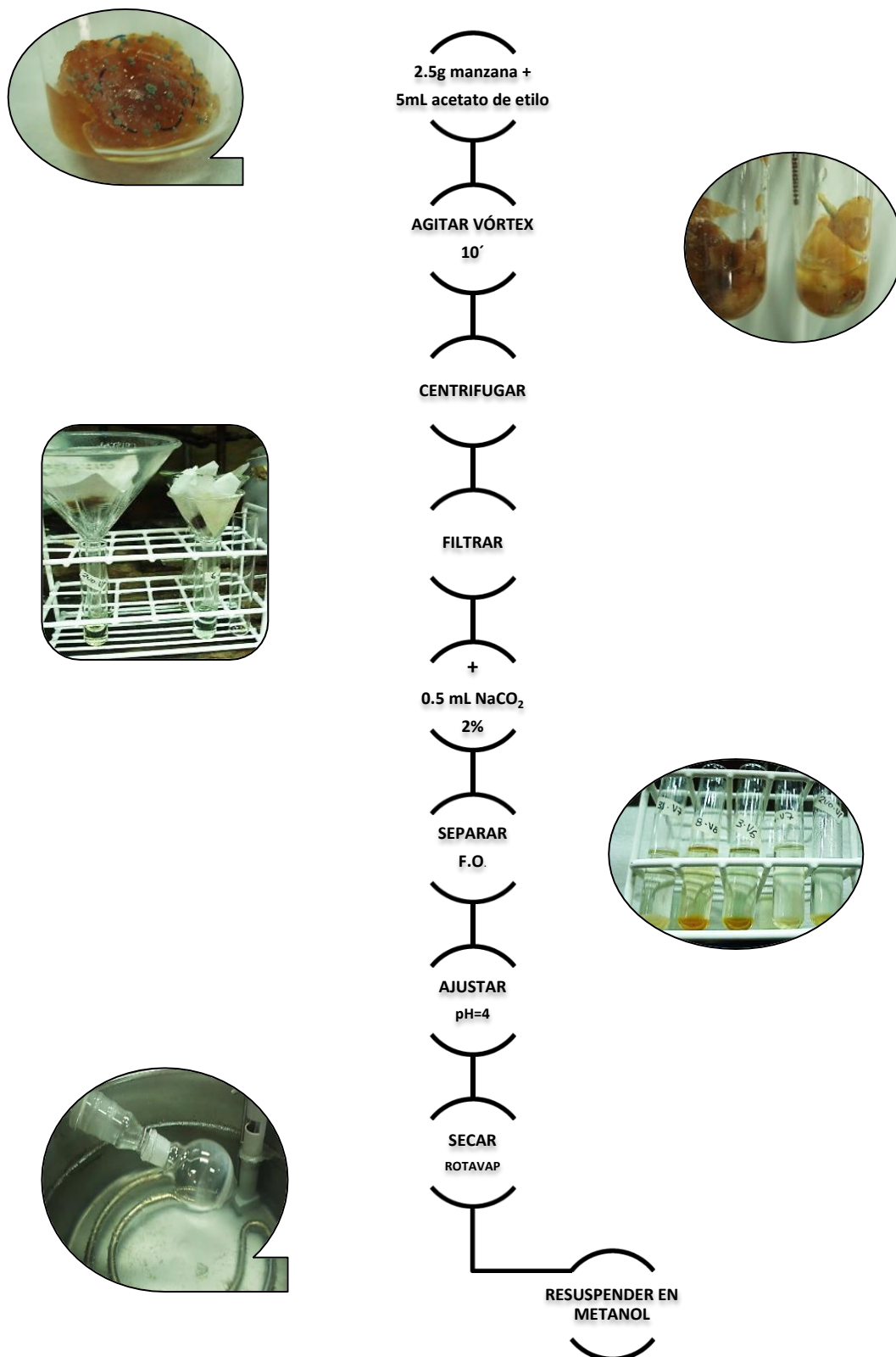
**Fig. N°18:** Procedimiento para la determinación de la patogenicidad (Elaboración propia).

#### 4.7 Determinación de la producción de patulina en sustrato natural

Luego de la producción de toxinas de *Penicillium expansum* en manzanas (punto 6: Determinación de la patogenicidad); se extrajo la patulina de los tejidos de la lesión, siguiendo el procedimiento descrito por Chiraz *et al.*<sup>77</sup>.

- ❖ Procedimiento de extracción para toxinas desde manzanas inoculadas (Ver procedimiento esquematizado en Fig. N°19)
  - a. Separar 2.5g de la lesión de la manzana, en forma de cono.
  - b. Agregar 5mL de acetato de etilo.
  - c. Con una varilla reducir el tamaño de partícula. Agitar con Vórtex durante 10 minutos.
  - d. Centrifugar a 25°C, 4500 RPM, durante 5 minutos.
  - e. Filtrar y al filtrado agregar 0.5mL Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> 2%.
  - f. Agitar con Vórtex durante 3 minutos.
  - g. Separar la fase orgánica.
  - h. Ajustar el pH a 4, con ácido acético 36% o Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> 2%.
  - i. Evaporar a sequedad a 60 °C en rotavapor.
  - j. Reconstituir en 0.5mL de metanol calidad HPLC.

El análisis de patulina, el sistema de solventes y detección, así como la determinación de la patulina extraída se detalla en los puntos 5.3, 5.4 y 5.5 respectivamente.



**Fig. N°19:** Procedimiento de extracción de patulina (Elaboración propia).



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Aislamiento e identificación

Se analizaron 10 muestras de uvas variedad Malbec, cultivadas en las localidades de Valle Azul y Maiqué en Río Negro, Argentina. Se enfocó el estudio en los géneros con especies potencialmente toxicogénicas. Se obtuvieron 441 aislamientos totales de los cuales 85 pertenecían al género *Alternaria* y 180 al género *Penicillium*.

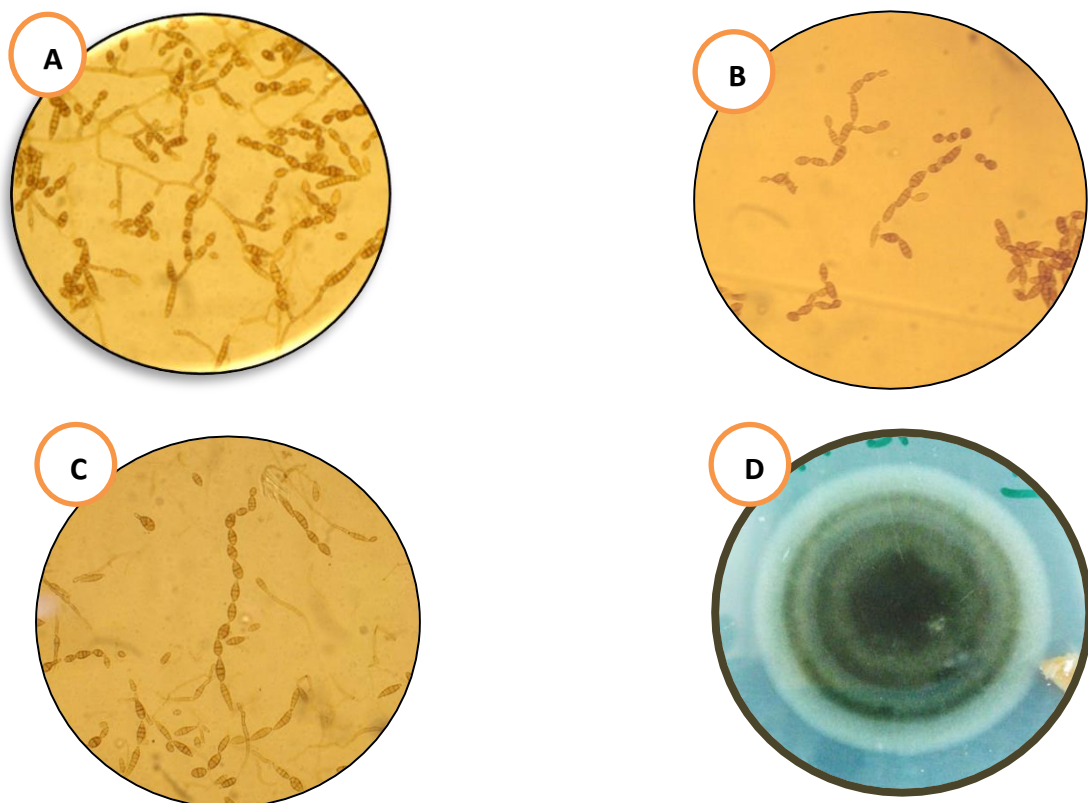
#### 5.1.1 *Alternaria*

Se determinó la presencia de *Alternaria* en el 70% de las muestras. Los aislamientos obtenidos se detallan en la Tabla N°3.

MUESTRA	TOTAL DE AISLAMIENTOS	AISLAMIENTOS							
VAM 1	42	3 V1	4 V1	7 V1	8 V1	9 V1	12 V1	14 V1	15 V1
		17 V1	19 V1	22 V1	23 V1	24 V1	25 V1	26 V1	27 V1
		29 V1	30 V1	31 V1	32 V1	33 V1	34 V1	35 V1	36 V1
		37 V1	39 V1	40 V1	41 V1	42 V1	43 V1	44 V1	45 V1
		47 V1	48 V1	49 V1	50 V1	51 V1	52 V1	53 V1	54 V1
		55 V1	63 V1	-	-	-	-	-	-
VAM 2	22	1 V2	2 V2	3 V2	4 V2	7 V2	9 V2	11 V2	12 V2
		13 V2	15 V2	16 V2	17 V2	19 V2	20 V2	22 V2	23 V2
		24 V2	27 V2	28 V2	31 V2	32 V2	34 V2	-	-
VAM 3	1	1 V3							
VAM 4	0	-							
VAM 5	1	1 V5							
VAM 6	2	1 V6				4 V6			
VAM 7	0	-							
VAM 8	0	-							
RM 1	1	2 R1							
RM 2	16	1 R2	2 R2	3 R2	6 R2	7 R2	8 R2	9 R2	10 R2
		11 R2	12 R2	13 R2	14 R2	15 R2	16 R2	17 R2	18 R2
TOTAL DE AISLAMIENTOS		85							

**Tabla N°3:** Detalle de los aislamientos de *Alternaria* obtenidos a partir de cada muestra analizada.

Se determinó el grupo-especie al que pertenecía cada aislamiento según la observación de los modelos de esporulación establecidos por Simmons<sup>56</sup> (Fig. N° 20).



**Fig. N°20:** Observaciones microscópicas de los grupo-especies de *Alternaria* de cultivos de 7 días en PZA: A) *Alternaria arborescens*. B) *Alternaria alternata*. C) *Alternaria tenuissima*. D) Observación macroscópica.

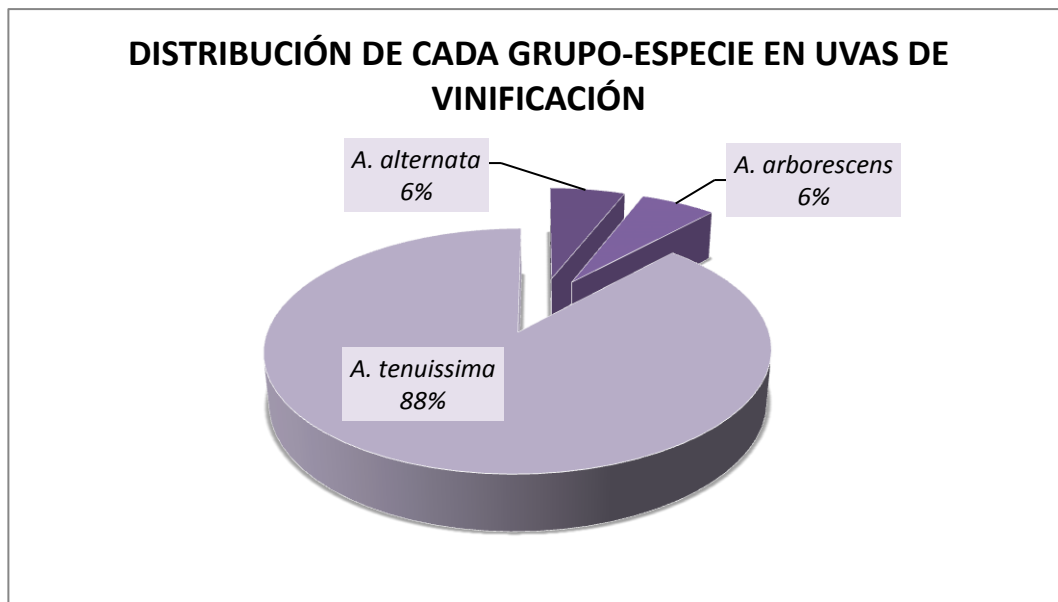
Se encontró un total de 5 aislamientos pertenecientes al grupo especie *A. alternata*, 75 pertenecientes al grupo-especie *A. tenuissima* y 5 pertenecientes al grupo-especie *A. arborescens*. La frecuencia de los aislamientos se detalla en la Tabla N°4.

CEPA	GRUPO ESPECIE	CEPA	GRUPO ESPECIE
3 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	2 V2	<i>Alternaria tenuissima</i>
4 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	3 V2	<i>Alternaria tenuissima</i>

7 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	4 V2	<i>Alternaria tenuissima</i>
8 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	7 V2	<i>Alternaria alternata*</i>
9 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	9 V2	<i>Alternaria tenuissima</i>
12 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	11 V2	<i>Alternaria tenuissima</i>
14 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	12 V2	<i>Alternaria alternata*</i>
15 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	13 V2	<i>Alternaria tenuissima</i>
17 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	15 V2	<i>Alternaria tenuissima</i>
19 V1	<i>Alternaria arborescens</i>	16 V2	<i>Alternaria tenuissima</i>
22 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	17 V2	<i>Alternaria tenuissima</i>
23 V1	<i>Alternaria alternata*</i>	19 V2	<i>Alternaria tenuissima</i>
24 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	20 V2	<i>Alternaria tenuissima</i>
25 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	22 V2	<i>Alternaria tenuissima</i>
26 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	23 V2	<i>Alternaria tenuissima</i>
27 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	24 V2	<i>Alternaria tenuissima</i>
29 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	27 V2	<i>Alternaria tenuissima</i>
30 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	28 V2	<i>Alternaria tenuissima</i>
31 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	31 V2	<i>Alternaria tenuissima</i>
32 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	32 V2	<i>Alternaria tenuissima</i>
33 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	34 V2	<i>Alternaria tenuissima</i>
34 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	1 V3	<i>Alternaria tenuissima</i>
35 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	1 V5	<i>Alternaria tenuissima</i>
36 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	1 V6	<i>Alternaria tenuissima</i>
37 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	4 V6	<i>Alternaria tenuissima</i>
39 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	2 R1	<i>Alternaria tenuissima</i>
40 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	1 R2	<i>Alternaria tenuissima</i>
41 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	2 R2	<i>Alternaria tenuissima</i>
42 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	3 R2	<i>Alternaria tenuissima</i>
43 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	6 R2	<i>Alternaria arborescens</i>
44 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	7 R2	<i>Alternaria tenuissima</i>
45 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	8 R2	<i>Alternaria arborescens</i>
47 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	9 R2	<i>Alternaria arborescens</i>
48 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	10 R2	<i>Alternaria tenuissima</i>
49 V1	<i>Alternaria alternata</i>	11 R2	<i>Alternaria tenuissima</i>
50 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	12 R2	<i>Alternaria tenuissima</i>
51 V1	<i>Alternaria alternata</i>	13 R2	<i>Alternaria tenuissima</i>
52 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	14 R2	<i>Alternaria tenuissima</i>
53 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	15 R2	<i>Alternaria tenuissima</i>
54 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	16 R2	<i>Alternaria tenuissima</i>
55 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	17 R2	<i>Alternaria tenuissima</i>
63 V1	<i>Alternaria tenuissima</i>	18 R2	<i>Alternaria tenuissima</i>
1 V2	<i>Alternaria arborescens</i>	-	-

**Tabla N°4:** Identificación de los aislamientos obtenidos del género *Alternaria*.

El porcentaje de distribución fue de 5.9% (5/85) para el grupo-especie *A. alternata*, 88.2 % (75/85) para el grupo-especie *A. tenuissima* y un 5.9 % (5/85) para el grupo-especie *A. arborescens* (Fig. N°21).



**Fig. N°21:** Porcentaje de distribución de grupo-especies de *Alternaria*.

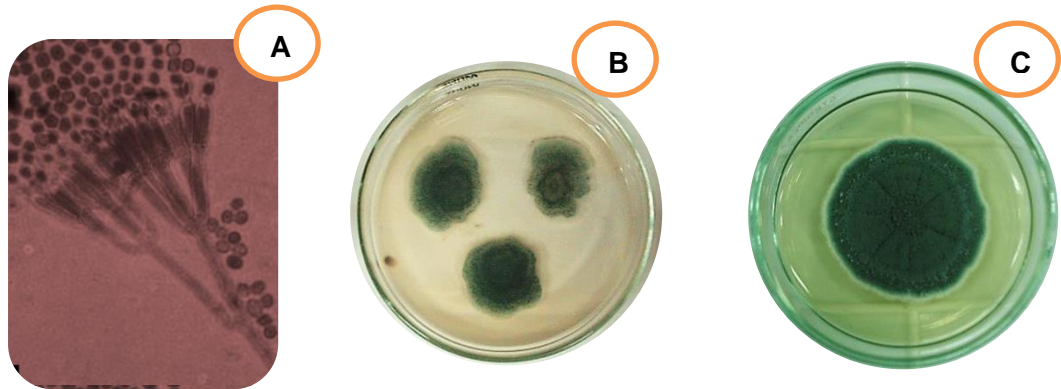
### 5.1.2 *Penicillium*

De las 10 muestras analizadas se obtuvieron 180 aislamientos pertenecientes al género *Penicillium*. Los aislamientos por cada muestra se detallan en la Tabla N°5.

MUESTRA	TOTAL DE AISLAMIENTOS
VAM 1	7
VAM 2	9
VAM 3	2
VAM 4	0
VAM 5	3
VAM 6	3
VAM 7	94
VAM 8	9
RM 1	41
RM 2	12
<b>TOTAL</b>	<b>180</b>

**Tabla N° 5:** Aislamientos de *Penicillium* obtenidos a partir de cada muestra analizada.

De las 10 muestras de uvas, se obtuvieron 180 aislamientos pertenecientes al género *Penicillium*, de las cuales 43 fueron clasificados como *P. expansum* (Tabla N°6)<sup>50,57,74</sup> (Fig. N°22).



**Fig. N°22:** *Penicillium expansum*. A) Observación microscópica. B) Cultivo de 7 días en PDA. C) Cultivo de 7 días en CYA

MUESTRA	TOTAL DE AISLAMIENTOS	AISLAMIENTOS				
VAM 1	3	2 vo V1	7 V1	10 V1	-	
VAM 2	2	2 V2	6 V2	-		
VAM 3	1	1 V3				
VAM 6	1	3 V6				
VAM 7	29	1 V7	2 V7	4 V7	5 V7	6 V7
		7 V7	9 V7	10 V7	11 V7	13 V7
		14 V7	15 V7	16 V7	17 V7	18 V7
		19 V7	20 V7	21 V7	22 V7	23 V7
		24 V7	26 V7	27 V7	28 V7	29 V7
		31 V7	36 V7	37 V7	40 V7	-
VAM 8	7	1 V8	3 V8	4 V8	5 V8	6 V8
		8 V8	9 V8	-		
TOTAL DE AISLAMIENTOS		43				

**Tabla N°6:** Procedencia de los 43 aislamientos de *P. expansum*.

## 5.2 Determinación de la capacidad toxicogénica de los aislamientos de *Alternaria*. Producción de las micotoxinas más comunes (AOH, AME, AT)

Se determinó la capacidad toxicogénica de 50 aislamientos (Tabla N°7).

ORDEN	GRUPO- ESPECIE	CEPA	AOH mg/kg	AME mg/kg	AT mg/kg
1	<i>A. arborescens</i>	19 V1	0,003	ND	0,016
2		1 V2	0,018	0,017	0,618
3		6 R2	0,003	ND	3,587
4		8 R2	0,016	0,017	0,890
5		9 R2	0,003	ND	2,645
6	<i>A. alternata</i>	23 V1	0,003	ND	0,019
7		49 V1	0,003	ND	2,654
8		51 V1	0,016	0,022	0,022
9		7 V2	0,012	0,020	10,093
10		12 V2	0,003	ND	3,344
11	<i>A. tenuissima</i>	3 V1	0,018	ND	21,031
12		4 V1	0,004	ND	0,016
13		7 V1	0,005	ND	3,975
14		9 V1	0,003	ND	2,612
15		12 V1	0,004	ND	0,018
16		14 V1	0,006	ND	0,025
17		15 V1	0,057	0,122	19,622
18		17 V1	0,031	0,050	16,232
19		22 V1	0,047	0,080	3,394
20		24 V1	0,011	0,001	9,004
21		26 V1	0,004	ND	0,060
22		27 V1	0,005	0,018	15,986
23		31 V1	0,008	ND	0,228
24		32 V1	0,004	ND	0,954
25		33 V1	0,032	0,048	2,003
26		34 V1	0,003	ND	0,027
27		35 V1	0,040	0,094	7,256
28		36 V1	0,003	ND	0,024
29		37 V1	0,055	0,133	0,023
30		40 V1	0,027	0,033	0,017
31		42 V1	0,012	0,005	1,623
32		43 V1	0,004	ND	0,019
33		45 V1	0,019	0,061	0,017
34		47 V1	0,025	0,049	0,019
35		48 V1	0,003	ND	0,261

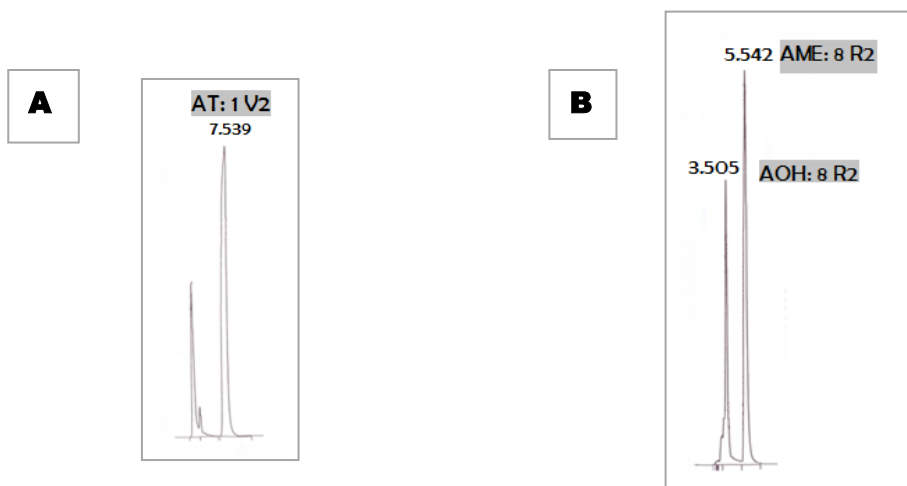
36		50 V1	0,014	ND	3,257
37		54 V1	ND	ND	0,394
38		63 V1	0,017	0,004	0,020
39		16 V2	0,003	ND	0,022
40		28 V2	0,003	ND	0,415
41		31 V2	0,004	ND	0,033
42		32 V2	0,004	ND	0,016
43		4 V6	0,004	ND	3,700
44		2 R1	0,003	ND	1,113
45		2 R2	0,006	ND	0,998
46		3 R2	0,003	ND	0,588
47		13 R2	0,006	ND	0,018
48		16 R2	0,003	ND	1,880
49		17 R2	0,010	0,029	12,031
50		18 R2	0,003	ND	0,025

**ND:** No determinado

**Tabla N° 7:** Perfiles de producción de micotoxinas de *Alternaria*.

En la Fig. N°23 se muestran cromatogramas de dos aislamientos: 1 V2 y 8 R2.

**Fig. N° 23:** Cromatogramas de aislamientos. A) AT: 1 V2. B) AOH y AME: 8 R2



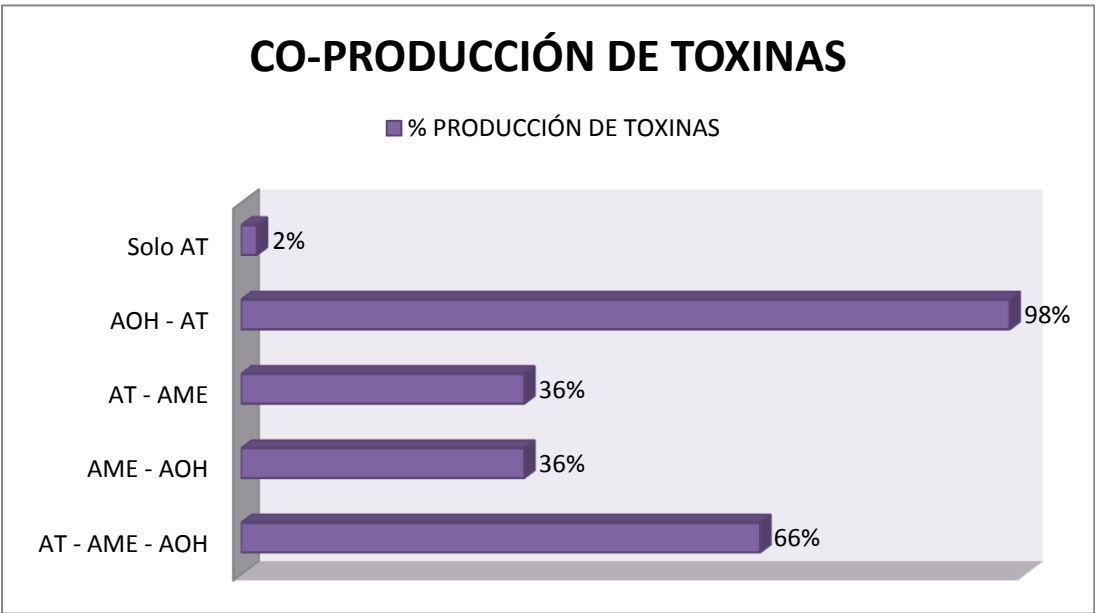
Las curvas de calibración de los estándares de AOH, AME y AT; se detallan en las Fig. N°25-27 y sus cromatogramas en la Fig. N°28.

## PERFILES DE PRODUCCIÓN DE TOXINAS

El perfil toxigénico de los aislamientos de *Alternaria* spp. de uvas patagónicas se muestra en la Tabla N°8. Se observó que todos los aislamientos resultaron ser productores de micotoxinas.

Para Ácido Tenuazónico (AT) todos los aislamientos resultaron productores (50/50) en niveles que fueron desde los 0.016 a 21.031 mg/kg. Con respecto a la producción de Alternariol (AOH) se determinó que el 98% (49/50) de los aislamientos resultaron productores de esta micotoxina, en niveles de 0.003 a 0.057 mg/kg. Para la producción de Alternariol Metil Eter (AME) se observó que el 36% de los aislamientos (18/50) resultó ser productor de la toxina, en niveles de 0.001 a 0.133 mg/kg. AT resultó ser la toxina producida en concentraciones más altas.

Con respecto a la co-producción de las toxinas, 33 aislamientos (66%) fueron positivos para todas las tres toxinas, 18 (36%) tanto para AOH y AME, 18 (36%) tanto para el AT y AME, y 49 (98%) para la AT y AOH. Un aislamiento fue positivo para una micotoxina (1 de AT) (Fig. N°24).



**Fig. N°24:** Co-producción de toxinas de *Alternarias*.

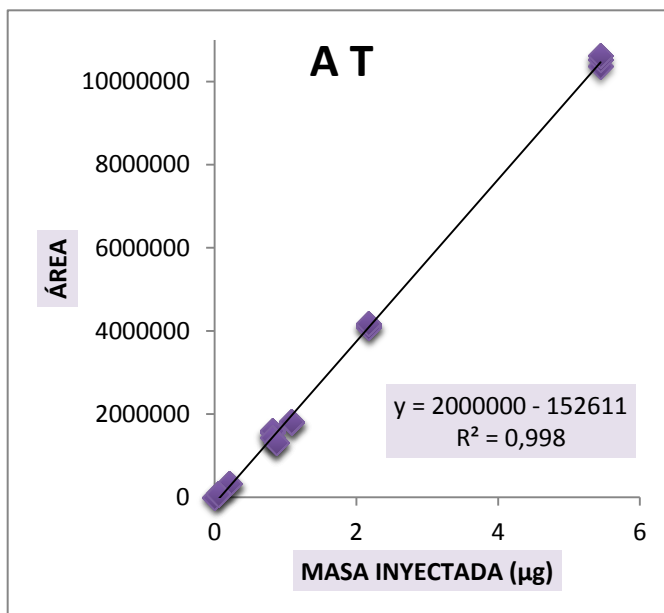
ESPECIE	No. DE	PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS
---------	--------	---------------------------



AISLAMIENTOS		MICOTOXINA	POSITIVAS	PROMEDIO (mg/Kg)	RANGO (mg/Kg)
<i>A. tenuissima</i>	40 (78.4%)	AT	40	3.195	0.016 – 21.031
		AOH	39	0.013	0.003 – 0.057
		AME	14	0.052	0.001 – 0.133
<i>A. alternata</i>	5 (9.8%)	AT	5	3.227	0.019 – 10.093
		AOH	5	0.007	0.003 – 0.016
		AME	2	0.021	0.020 – 0.022
<i>A. arborescens</i>	5 (9.8%)	AT	5	1.551	0.016 – 3.587
		AOH	5	0.009	0.003 – 0.018
		AME	2	0.017	0.017

**Tabla N° 8:** Producción de micotoxinas de los grupo-especies de *Alternaria*.

STD	MASA INYECTADA (µg)	ÁREAS
	0	0
AT1	5,4454	10369636
	5,4454	10515667
	5,4454	10621496
AT2	2,1782	4131189
	2,1782	4088798
	2,1782	4169910
AT3	0,8168	1560649
	0,8168	1596223
	0,8168	1439145
AT4	0,8712	1317261
	0,8712	1313639
	0,8712	1318274
AT5	0,2178	318477
	0,2178	333545
	0,2178	328588
AT6	1,088	1812929
	1,088	1785028
	1,088	1813925
AT7	0,0544	71991
	0,0544	81151
	0,0544	74867



**Fig. N°25:** Curva de calibración de AT estándar.

STD	MASA INYECTADA (µg)	AREAS
	0	0
AOH3	0,02126	164788
	0,02126	176937
	0,02126	162418
AOH2	0,2126	1597219
	0,2126	2037395
	0,2126	1540995
AOH6	1,06318	10388310
	1,06318	9150228
	1,06318	10305975
AOH5	2,12636	20220792
	2,12636	19698664

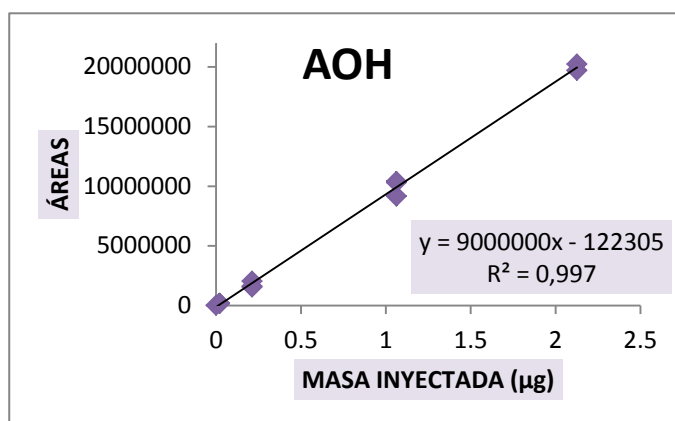


Fig. N°26: Curva de calibración de AOH estándar.

STD	MASA INYECTADA (µg)	ÁREAS
	0,000	0
AME 1	0,112	1228638
	0,112	1078016
	0,112	894058
AME 2	0,559	5108441
	0,559	5032868
	0,559	5274149
AME 4	1,342	11123966
	1,342	11068297
AME 5	2,236	17588532
	2,236	18410218
	2,236	18385840

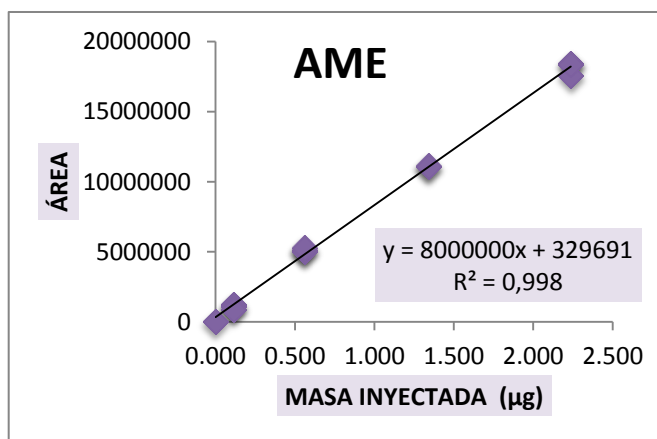


Fig. N°27: Curva de calibración de AME estándar.

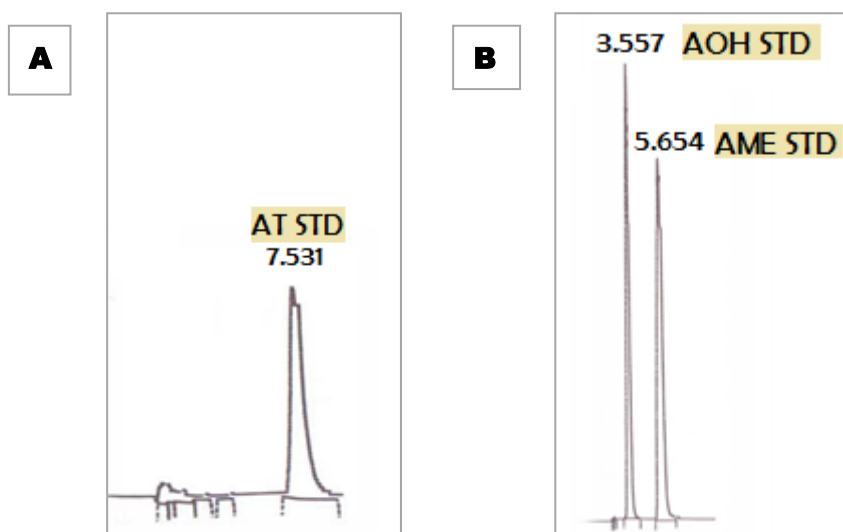


Fig. N°28: Cromatogramas. A) AT estándar. B) AOH y AME estándar.

### 5.3 Determinación de la capacidad toxicogénica de los aislamientos de *Penicillium expansum*.

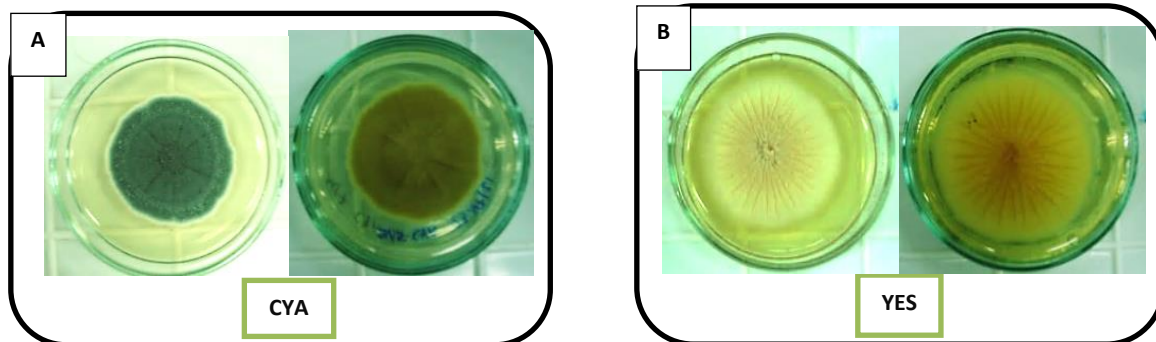
Se determinó su capacidad de producción de patulina de 43 *Penicillium expansum* en los medios de cultivo CYA y YES (Tabla N°9 y Fig. N°29).

AISLAMIENTO		PATULINA ug /g	AISLAMIENTO		PATULINA ug /g
1	2 vo V1	193,022	23	19 V7	178,658
2	7 V1	88,300	24	20 V7	138,345
3	10 V1	334,369	25	21 V7	240,292
4	2 V2	54,290	26	22 V7	165,118
5	6 V2	278,701	27	23 V7	214,988
6	1 V3	206,958	28	24 V7	321,492
7	3 V6	86,444	29	26 V7	82,198
8	1 V7	78,529	30	27 V7	198,326
9	2 V7	32,424	31	28 V7	312,343
10	4 V7	202,165	32	29 V7	212,627
11	5 V7	220,189	33	31 V7	206,700
12	6 V7	113,626	34	36 V7	174,323
13	7 V7	144,974	35	37 V7	156,148
14	9 V7	96,296	36	40 V7	175,276
15	10 V7	6,838	37	1 V8	194,045
16	11 V7	51,355	38	3 V8	103,000
17	13 V7	259,016	39	4 V8	36,163
18	14 V7	117,064	40	5 V8	22,397
19	15 V7	194,287	41	6 V8	15,099
20	16 V7	193,486	42	8 V8	110,126
21	17 V7	240,609	43	9 V8	96,802
22	18 V7	234,143			

**Tabla N°9:** Producción de patulina en medio de cultivo.

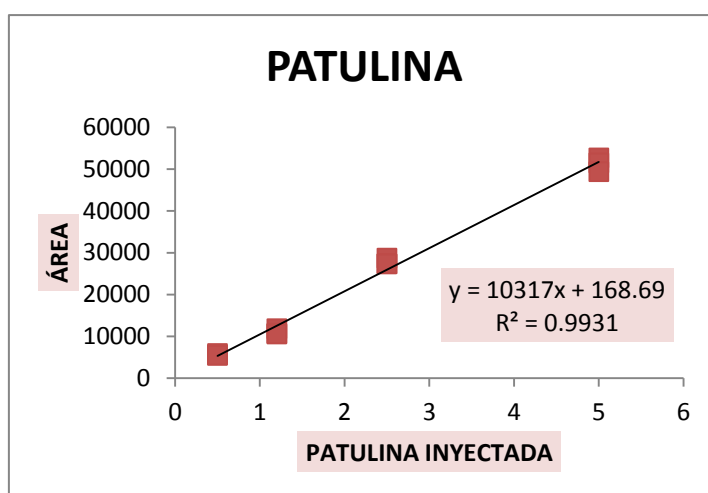
Se observó que todos los aislamientos analizados produjeron patulina. Esto implica en niveles de 6,838 a 334,369 ug/g

La curva de calibración del estándar de patulina se detalla en la Fig. N°30 y su cromatograma en la Fig. N°31. El cromatograma del aislamiento 6 V7 se muestra en la Fig. N°32.

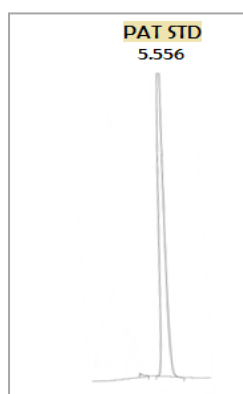


**Fig. N°29:** *Penicillium expansum* cultivo de 7 días, anverso y reverso A) CYA. B) YES.

PATULINA INYECTADA µg	ÁREA
0,5	5479
0,5	5861
0,5	5458
1,2	11804
1,2	10690
1,2	10561
2,5	28696
2,5	27358
2,5	27336
5	52661
5	51475
5	49387



**Fig. N°30:** Curva de calibración de patulina estándar.



**Fig. N°31:** Cromatograma del estándar de patulina



**Fig. N°32:** Cromatograma del aislamiento 6 V7

## 5.4 Determinación de la patogenicidad de los aislamientos de *Penicillium expansum*.

La patogenicidad de las 43 cepas analizadas de *Penicillium expansum* fue determinada de acuerdo al diámetro de la lesión externa producida en manzanas.

Las lesiones típicas externas observadas se muestran en la Fig. N°34. El diámetro a los 14 días de la lesión es detallado en la Tabla N°10.

AISLAMIENTO	DIÁM *	PATOG**	AISLAMIENTO	DIÁM *	PATOG**
2 vo V1	67	+++	19 V7	55	++
7 V1	65	+++	20 V7	60	++
10 V1	60	++	21 V7	47	++
2 V2	60	++	22 V7	30	+
6 V2	17	+	23 V7	13	+
1 V3	60x80	+++	24 V7	20	+
3 V6	56	++	26 V7	47	++
1 V7	65	+++	27 V7	27	+
2 V7	60	++	28 V7	45	++
4 V7	55x60	++	29 V7	60	++
5 V7	35	+	31 V7	50	++
6 V7	55x65	++	36 V7	15	+
7 V7	13	+	37 V7	20	+
9 V7	38	+	40 V7	50	++
10 V7	35	+	1 V8	75	+++
11 V7	50	++	3 V8	75	+++
13 V7	14	+	4 V8	60	++
14 V7	15	+	5 V8	65	+++
15 V7	27	+	6 V8	57	++
16 V7	55	++	8 V8	45	++
17 V7	47	++	9 V8	70	+++
18 V7	58	++			

(\*) Diámetro de la lesión (mm) a los 14 días.

(\*\*)Grado de patogenicidad

**Tabla N°10:** Evaluación de la patogenicidad según la lesión en manzanas.

Considerando las lesiones externas producidas en las manzanas, se ponderó el grado de patogenicidad como se detalla en la Tabla N°11.

GRADO DE PATOGENICIDAD	DIÁMETRO DE LA LESIÓN (mm)
Patógeno leve (+)	Entre 13 y 38
Patógeno moderado (++)	Entre 39 y 64
Muy patógeno (+++)	Entre 65 y 90

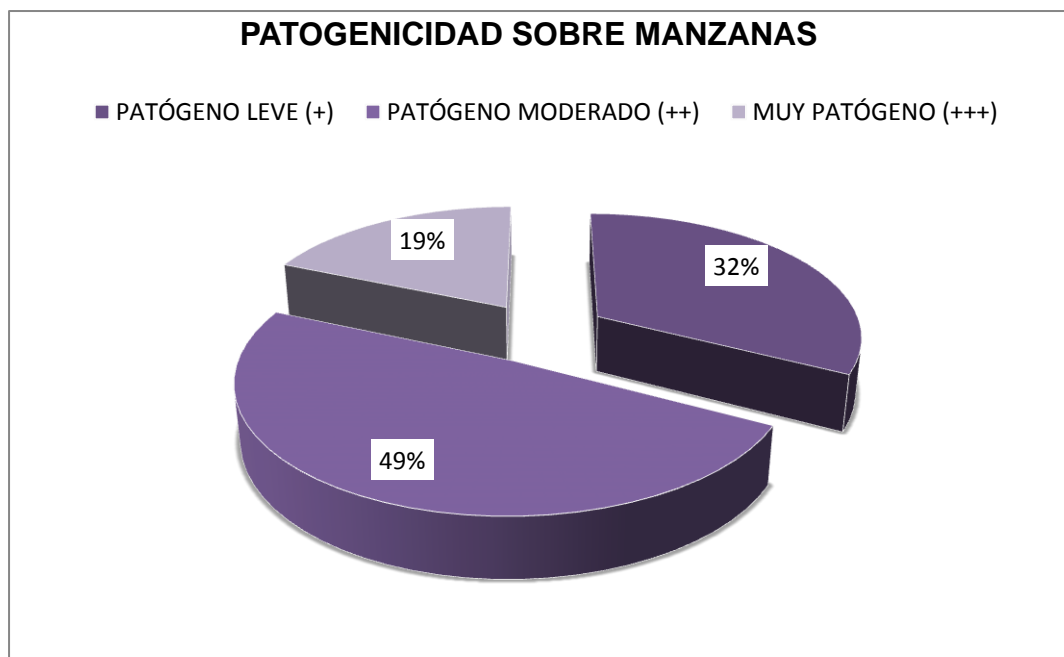
**Tabla N°11:** Ponderación del grado de patogenicidad.

Se observó que 32.6% de los aislamientos evaluados (14/43) resultaron ser levemente patógenos, siendo el 48.8% (21/43) moderadamente patógenos y el 18.6% (8/43) fue considerado como muy patógeno (Ver Tabla N°12 y Fig. N°33).

Todos los aislamientos de *Penicillium expansum* produjeron lesión sobre las manzanas.

GRADO DE PATOGENICIDAD	NÚMERO DE CEPAS	PORCENTAJE
Patógeno leve (+)	14	32.6 %
Patógeno moderado (++)	21	48.8 %
Muy patógeno (+++)	8	18.6 %

**Tabla N°12:** Comparación de aislamientos de *P. expansum* según el grado de patogenicidad.



**Fig. N°33:** Porcentaje según el grado de patogenicidad en manzanas.



**Fig. N°34:** Lesión típica producida por *Penicillium expansum* en el exterior de manzanas.

## 5.5 Determinación de la producción de patulina en sustrato natural.

A partir de las manzanas inoculadas con las cepas de *Penicillium expansum* para la determinación de la patogenicidad, se evaluó la producción de patulina en el sustrato natural: manzana. A continuación se detalla la concentración de patulina determinada (Tabla N°13)

AISLAMIENTO		PATULINA ug /g	AISLAMIENTO		PATULINA ug /g
1	2 vo V1	7,063	23	19 V7	0,259
2	7 V1	10,059	24	20 V7	3,016
3	10 V1	3,932	25	21 V7	6,060
4	2 V2	1,764	26	22 V7	0,838
5	6 V2	2,681	27	23 V7	0,393
6	1 V3	ND	28	24 V7	16,429
7	3 V6	21,565	29	26 V7	16,077
8	1 V7	1,387	30	27 V7	19,350
9	2 V7	7,545	31	28 V7	43,078
10	4 V7	36,365	32	29 V7	13,454
11	5 V7	25,123	33	31 V7	20,025
12	6 V7	21,102	34	36 V7	1,109
13	7 V7	0,988	35	37 V7	12,004
14	9 V7	3,105	36	40 V7	20,386
15	10 V7	21,125	37	1 V8	ND
16	11 V7	15,360	38	3 V8	0,471
17	13 V7	1,217	39	4 V8	8,439
18	14 V7	0,982	40	5 V8	1,465
19	15 V7	4,292	41	6 V8	0,705
20	16 V7	11,946	42	8 V8	3,201
21	17 V7	0,212	43	9 V8	9,420
22	18 V7	1,068			

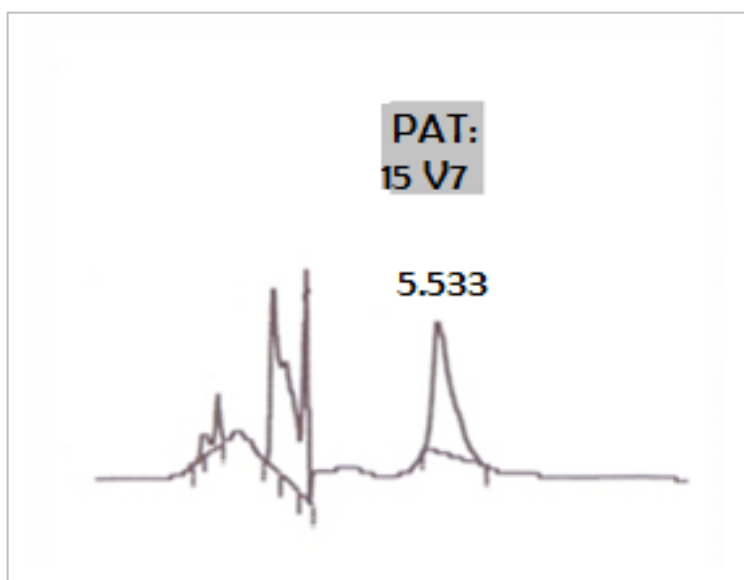
**ND:** No determinado

**Tabla N° 13:** Producción de patulina por aislamientos de *P. expansum* en sustrato natural.



Se observó que solo 2 aislamientos analizados no produjeron patulina. Esto implica que el 95.3%, (41/43) de aislamientos de *Penicillium expansum*, son micotoxigénicos. Los niveles de producción se encontraron en un rango de 0,212 a 43,078 ug/g.

La curva de calibración del estándar de patulina; se detalla en la Fig. N°30. En la Fig. N°35 se muestra el cromatograma correspondiente al aislamiento 15 V7.



**Fig. N°35:** Cromatograma del aislamiento 15 V7.

## 6. DISCUSIÓN

### **Aislamiento e identificación de especies de *Alternaria* y *Penicillium*.**

En este estudio se analizó la micobiota de las uvas para vinos de la Provincia de Río Negro, en la Patagonia Argentina.

La vitivinicultura de la Región Patagónica Argentina posee características ecológicas propias que contribuyen a diferenciar la calidad de las uvas y de los vinos elaborados. En esta zona se encuentran las bodegas más australes del país (38° a 42° de latitud), ubicadas en el Alto Valle de Río Negro.

Río Negro fue la provincia pionera en la región y sus bodegas han estado desde siempre en la industria vitivinícola del país. La producción, en el 2013, alcanzó a 80.08 quintales métricos de uvas destinadas a vinificación, siendo la séptima región productora a nivel nacional.

Esta región del país se caracteriza por poseer un clima continental seco, escaso régimen de lluvias, buena insolación, y una gran amplitud térmica durante el período de maduración de las uvas. Estas características, sumadas a los suelos aluvionales, permiten el cultivo de finos cepajes que dan origen a vinos muy equilibrados. La mejor virtud de esta zona es el viento fuerte, ya que produce sequedad en el ambiente evitando la aparición de enfermedades y esto se traduce en la posibilidad de la elaboración de vinos orgánicos, sin adición de agroquímicos. Por su clima frío, las uvas y mostos presentan características diferentes de las zonas andinas, mayor contenido de acidez y regular tenor azucarino. Se elaboran vinos genéricos y de apreciable calidad enológica<sup>78</sup>.

En este trabajo, se aislaron 441 cepas de hongos en total, de los cuales el 40.8% pertenece al género *Penicillium* y el 21.8% al género *Alternaria*. Se realizó la identificación de los diferentes aislamientos pertenecientes a los géneros productores de toxinas: *Alternaria* y *Penicillium*.

En relación a los géneros aislados, los resultados obtenidos en este estudio, mostraron similitudes con los obtenidos en trabajos previos con uvas de vino. En Asia, se identificaron hongos contaminantes en uvas de viñedos chinos, siendo los géneros más frecuentes, en orden decreciente, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Mucor*; *Alternaria* fue

principalmente aislado de bayas de uva intactas, pero rara vez de las bayas podridas<sup>21</sup>. En Eslovaquia, se analizó la micobiota relacionada a uvas; se aislaron cepas de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* y *Fusarium*<sup>22</sup>. Desde uvas y vinos de Europa e Israel, fueron aisladas 441 cepas *Aspergillus* y 101 cepas de *Penicillium* para el análisis de micotoxinas<sup>23</sup>. En otro estudio, se analizaron uvas de Hungría y República Checa (25 viñedos). Se aislaron hongos potencialmente toxigénicos incluyendo *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum* y especies de *Alternaria*<sup>24</sup>.

En Portugal se identificaron 27 géneros fúngicos de 11 viñedos de distintas regiones. Los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* representaron el 15 y 24% respectivamente, estos géneros variaron significativamente según el origen geográfico. *Penicillium* fue descrito frecuentemente en las regiones templadas<sup>25</sup>. Gómez *et al.*<sup>26</sup>, determinaron que la micobiota predominante de 4 viñedos españoles pertenecía a *Aspergillus* spp., seguido por *Alternaria* spp., *Penicillium* spp. y *Cladosporium* spp., representando el 79,7%, 13,4%, 8% y el 4,4% de las bayas respectivamente. En España, la micoflora aislada a partir de uvas incluyó, en orden decreciente: *Alternaria*, levaduras, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Epicoccum*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Phoma*, *Trichoderma* y *Ulocladium*<sup>27</sup>.

En estudios realizados en Sudamérica, muestran similitud con los resultados obtenidos por Da Rocha Rosa *et al.*<sup>36</sup>, en uvas de Argentina y Brasil se determinaron como principales géneros fúngicos contaminantes a *Aspergillus*, *Penicillium* y *Botrytis*. Otros géneros identificados, en orden decreciente, fueron: *Phytophthora*, *Moniliella*, *Alternaria* y *Cladosporium*.

En Argentina, analizaron la micobiota de uvas para vinos y aislaron siete géneros de hongos filamentosos. Entre ellos *Alternaria* spp. (80%) y *Aspergillus* spp. (70%) fueron los más frecuentes; otros géneros fueron: *Cladosporium* spp. y *Penicillium* spp.<sup>35</sup> Desde pasas de uvas, se aislaron: *Aspergillus* (50,2%), *Eurotium* (21,4%) y *Penicillium* (13,5%); *Aspergillus niger* fue la especie más frecuente<sup>33</sup>.

La principal diferencia de nuestros resultados con los trabajos citados es que no se observó la presencia de *Aspergillus* en ninguna de las 10 muestras de uvas de ambas localidades estudiadas (Valles Maiqué y Azul). Esto representa una ventaja diferencial de la región estudiada, lo cual podría explicar por qué la incidencia de OTA en vinos de Argentina es baja, los vinos de esta región presentarían un riesgo de incidencia mucho menor de esta micotoxina<sup>48</sup>.

Las condiciones climáticas son determinantes para la producción de *Aspergillus*. Se determinó que las muestras de uvas que presentaron baja incidencia de *A. niger* (menos del 8%) pertenecieron a vinos verdes; de la región sub mediterránea cuyo clima a diferencia de las otras regiones de procedencia, es más frío tiene más precipitaciones y es más húmedo que el resto de las regiones, debido a las influencias atlánticas. En estos vinos, la especie fúngica dominante fue *Botrytis cinérea*, causa común de deterioro durante la cosecha. Apparently *A. niger* se correlaciona negativamente con *Alternaria*, *Cladosporium* y *A. flavus* <sup>25</sup>.

*Alternaria* spp. son importantes contaminantes de frutas, vegetales y productos de granos <sup>79</sup>. En el presente estudio se encontró un total de 5 aislamientos pertenecientes al grupo especie *A. alternata* (5.9%), 75 pertenecientes al grupo-especie *A. tenuissima* (88.2 %) y 5 pertenecientes al grupo-especie *A. arborescens* (5.9 %). En estudios previos, analizaron la micobiota de uvas para vinos de Argentina y dentro del género *Alternaria*, solo fue identificada *A. alternata* <sup>35</sup>.

La presencia de *Alternaria* spp. implica la potencial producción de sus toxinas, entre ellas AOH, AME y AT en las uvas y sus subproductos (Vinos, mostos y jugos).

La presencia de *Penicillium expansum* en uvas, es un potencial peligro de patulina en vinos. En Alemania se analizaron 96 muestras de mostos de diferentes calidades y tipos de uva. Se determinó que todos los mostos de la variedad Scheurebe contenían patulina, seguidos de las variedades Riesling y Borgoña; la mayor concentración de patulina (80mg/L) se determinó en racimos Scheurebe, seguido de Silvaner con 57,4mg/L <sup>42</sup>.

## **Capacidad toxicogénica de los aislamientos de *Alternaria* para la producción de AOH, AME y AT.**

Se observó que todos los aislamientos de *Alternaria* estudiados en este trabajo resultaron ser productores de micotoxinas.

Existen muy pocos estudios de la incidencia de AOH, AME y AT en uvas o vinos. Se analizó la producción de AME y AOH en 66 vinos. Se determinó AOH en 13/17 vinos tintos canadienses a niveles de 0,03 a 5,02 ng/mL y 7/7 vinos tintos importados a 0.27-19.4ng/mL, por lo general acompañado de concentraciones más bajas de AME. Jugos de uva (5positivos/10muestras) sólo contenían subniveles de ng AOH o AME / mL a excepción de una muestra (39ng AME / mL). Los vinos blancos (3/23 muestras), jugos de uva blanca (0/4 muestras) y jugos de arándano (1/5 muestras) contenían poco AOH/AME (<1,5 ng / mL) <sup>80</sup>.

Las toxinas producidas por esta especie (alternariol, éter monometílico alternariol, ácido tenuazónico, altertoxin I, II y III) se han reportado en varias frutas <sup>81</sup>.

## **Capacidad toxicogénica de los aislamientos de *Penicillium expansum***

A partir de las 10 muestras de uvas variedad Malbec, se obtuvieron 180 aislamientos de hongos del género *Penicillium*, de los cuales se clasificaron 43 como *P. expansum* y se determinó su capacidad de producción de patulina. Se observó que todos los aislamientos analizados produjeron patulina en niveles de 6,838 a 334,369 ug/g. En un estudio, se determinó que en uvas de Europa e Israel, de los 101 aislamientos de *Penicillium* 5 produjeron Patulina (3 *P. expansum* y 2 *P. griseofulvum*) <sup>23</sup>.

No existe, hasta el presente, datos de incidencia de toxinas de *Alternaria* y *Penicillium expansum* en vinos y jugos de uva en Argentina y Sudamérica.

La alta incidencia de especies toxicogénicas de *Alternaria* y de *P. expansum* en uvas de la región patagónica representa un riesgo que debe ser evaluado.

### **Respecto a la patogenicidad de los aislamientos de *Penicillium expansum***

Se observó que 32.6 % de los aislamientos evaluados (14/43) resultaron ser levemente patógenos, siendo el 48.8 % (21/43) moderadamente patógeno y el 18.6 % (8/43) fue considerado como muy patógeno.

*Penicillium expansum* es el responsable del moho o pobredumbre verde en las uvas; esto implica cuantiosas pérdidas en uvas de mesa que son almacenadas a 0°C por más de 60 días<sup>32,34</sup>.

### **Respecto a la producción de Patulina en sustrato natural**

Se observó que 2 aislamientos analizados no produjeron patulina en sustrato natural. Esto implica que el 95.3%, (41/43) de aislamientos de *Penicillium expansum*, son micotoxigénicos. Los niveles de producción se encontraron en un rango de 0,212 a 43,078 ug/g.

Este alto porcentaje de producción de patulina de *Penicillium expansum*, representa un riesgo en el consumo de uvas de mesa, las cuales no sufren un proceso previo para su consumo.

## 7. CONCLUSIONES

- 1) La incidencia de hongos toxicogénicos en uvas cultivadas en el valle de Río Negro fue de 40.8% para el género *Penicillium* y de 21.8% para el género *Alternaria* de 441 aislamientos en total. Se obtuvieron 85 aislamientos pertenecientes al género *Alternaria* de los cuales 5 pertenecían al grupo-especie *A. alternata*, 5 al grupo-especie *A. arborescens* y 75 al grupo-especie *A. tenuissima*. Se aislaron 180 *Penicillium*, de los cuales se identificaron 43 *Penicillium expansum*.
- 2) La capacidad toxicogénica fue determinada para las toxinas AOH, AME y AT de *Alternaria* y la toxina patulina de *Penicillium*. Se determinó los perfiles de producción (AOH, AME y AT); de los 50 aislamientos analizados, todos produjeron al menos una toxina y el 66% produjo las tres toxinas. De los 43 aislamientos de *P. expansum* todos resultaron productores de patulina en medio de cultivo.
- 3) La patogenicidad de los aislamientos de *P. expansum* se evaluó según la lesión característica producida en sustrato natural: manzanas. Todos los aislamientos produjeron la lesión, observándose que 32.6% resultaron ser levemente patógenos, siendo el 48.8% moderadamente patógenos y el 18.6% fue considerado como muy patógeno. A su vez se evaluó la capacidad de producir patulina en este sustrato, determinándose que el 95% la produjo.

## **8. RECOMENDACIONES O PERSPECTIVAS FUTURAS**

Se debería proseguir con el estudio de las poblaciones autóctonas contaminantes de uvas de la región. Determinándose asimismo la ocurrencia natural de las toxinas producidas *in vitro* en vinos y mostos.

Se determinaría, aplicando la misma metodología, cuáles son los principales géneros contaminantes de uvas cultivadas en otras regiones de Sudamérica, cuáles son las principales toxinas producidas y cuál es su ocurrencia natural.

Se compararían mediante métodos moleculares las especies de los diferentes géneros para determinar sus similitudes y diferencias.

Se diseñarían medidas de prevención y control de bajo impacto ambiental.



## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Council for Agricultural Science and Technology.** Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. USA: 2003. Disponible en: [http://www.trilogylab.com/uploads/Mycotoxin\\_CAST\\_Report.pdf](http://www.trilogylab.com/uploads/Mycotoxin_CAST_Report.pdf)
2. **Díaz A.** Evaluación de la ocratoxina A en el café (*Coffea arabica* L.) de las principales zonas cafetaleras [Tesis]. Lima (Perú): Universidad Agraria La Molina; 2012.
3. **Reyes V, Quevedo F.** Determinación de aflatoxina total y ocratoxina A en maca seca y en harina de maca. Revista Ciencia e Investigación. 2006;9(1):7-14
4. **Rojas J.** Evaluación del nivel de contaminación por la micotoxina "Ocratoxina" en muestras de *Capsicum Annuum* "Paprika" usando los métodos ELISA y Cromatografía líquida de alta performance "HPLC". Rev Horizonte Médico. 2008;8(2).
5. **Caballero J.** Niveles críticos de aflatoxina en muestras de maíz para consumo animal en Lima Metropolitana [Tesis]. Lima (Perú): Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2000.
6. **Pavlich M, De la Rosa S.** Determinación de aflatoxinas y fumonisinas en maíz de consumo humano. Revista Peruana BIOTA. 1999;17(99):25-31.
7. **Núñez J, Rojas J, Madueño C.** Intoxicación de truchas con aflatoxinas B1 en una piscigranja. IV congreso latinoamericano de microbiología e higiene de los alimentos; 1996.
8. **Código Internacional de Prácticas Enológicas.** Organización Internacional de Vino y la Viña (OIV). Parte I: Definiciones; 2014. p. I.1.1\_1 - I.1.1\_4. Disponible en: <http://www.oiv.int/oiv/info/enpublicationoiv?lang=en>
9. **Castellucci F.** Global economic vitiviniculture data. Organización Internacional de Vino y la Viña (OIV); 2013. p. 1–22. Disponible en: [www.oiv.int/oiv/files/EN\\_point%20de%20conj.pdf](http://www.oiv.int/oiv/files/EN_point%20de%20conj.pdf)
10. **INV (Instituto Nacional de Vitivinicultura).** Vitivinicultura Argentina, Reseña histórica. 2014. Disponible en: [http://www.inv.gov.ar/vitiv\\_arg.php](http://www.inv.gov.ar/vitiv_arg.php)
11. **Organización Internacional de Vino y la Viña (OIV).** State of the Vitiviniculture World Market; 2014. p. 3-5. Disponible en: [www.oiv.int/.../OIV\\_Note\\_Conj\\_2014\\_%20EN.pdf](http://www.oiv.int/.../OIV_Note_Conj_2014_%20EN.pdf)

12. **INV (Instituto Nacional de Vitivinicultura).** Informe Cosecha y Elaboración; 2013a. p. 21-23. Disponible en: <http://www.inv.gov.ar/PDF/Estadisticas/Cosecha/Cosecha2013/CaracteristicaCosecha2013.pdf>
13. **INV (Instituto Nacional de Vitivinicultura),** Caracterización Vitivinícola Argentina; 2010. p. 4. Disponible en: [www.inv.gov.ar/noticias/19022008/caracterizacion.pps](http://www.inv.gov.ar/noticias/19022008/caracterizacion.pps))
14. **INV (Instituto Nacional de Vitivinicultura).** Destino de la uva ingresada a establecimientos; 2013b. p. 3. Disponible en: <http://www.inv.gov.ar/PDF/Estadisticas/Cosecha/Cosecha2013/DestinoDeUva.pdf>
15. **Fernández I. 2013.** El Mercado de vino en el Perú. Oficina Económica y Comercial de la Embajada de España en Lima; 2007. p. 12. Disponible en: <http://www3.icex.es/icex/cma/contentTypes/common/records/mostrarDocumento/?doc=4705049>
16. **INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática).** Perú: Panorama Económico Departamental Diciembre 2013. Informe Técnico N° 2; 2014. p. 1. Disponible en: <http://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/boletines/panorama-economico-departamental-diciembre-2013.pdf>
17. **Ministerio de Agricultura.** Informe de registro de productores de uva en las regiones de Ica, Arequipa, Moquegua, Tacna y Lima provincias; 2008. p. 4.
18. **Barata A, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V.** Review The microbial ecology of wine grape berries. *Int J Food Microbiol.* 2012;153:243–259.
19. **Pearson R, Goheen A.** Compendium of Grape Diseases. The American Phytopathological Society. Minnesota; 1988.
20. **Lorenzini M, Zapparoli G.** Characterization and pathogenity of *Alternaria* spp. Strains associated with grape bunch post-harvest withering. *Int J Food Microbiol.* 2014;186:1–5.
21. **Chunmei J, Junling S, Qian H, Yanlin L.** Occurrence of toxin-producing fungi in intact and rotten table and wine grapes and related influencing factors. *Food Control.* 2013;31:5-13.
22. **Mikusová P, Santini A, Ritieni A, Pavlokin J, Srobárová A.** Berries contamination by microfungi in Slovakia vineyard regions: Impact of climate conditions on microfungi biodiversity. *Rev Iberoam Micol.* 2012;29(3):126–131.
23. **Bragulat M, Abarca M, Cabañes F.** Low occurrence of patulin- and citrinin-producing species isolated from grapes. *Lett Appl Microbiol ISSN.* 2008:0266-8254.

24. **Varga J, Koncz Z, Kocsubé S, Mátrai T, Téren J, Ostry V, et al.** Mycobiota of grapes collected in Hungarian and Czech vineyards in 2004. *Acta Alimentaria*. 2007;36(3):329–341.
25. **Serra R, Lourenco A, Alipio P, Venancio A.** Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Mycological Research*. 2006;110:971-978.
26. **Gómez C, Bragulat M, Abarca M, Mínguez S, Cabañes F.** Ochratoxin A-producing fungi from grapes intended for liqueur wine production. *Food Microbiol*. 2006;23:541–545.
27. **Belli N, Mitchell D, Marrín S, Alegre I, Ramos A, Mangan N, Sanchis V.** Ochratoxin A-producing fungi in Spanish wine grapes and their relationship with meteorological conditions. *Eur. J. Plant Pathol*. 2005;113:233–239.
28. **Leong S, Hocking A, Pitt J.** Occurrence of fruit rot fungi (*Aspergillus* section *Nigri*) on some drying varieties of irrigated grapes. *Aust. J. Grape Wine Res*. 2004;10:83–88.
29. **Chiotta M, Susca A, Stea G, Mulè G, Perrone G, Logrieco A, Chulze S.** Phylogenetic characterization and ochratoxin A – Fumonisin profile of black *Aspergillus* isolated from grapes in Argentina. *Int J Food Microbiol*. 2011;149:171–176.
30. **Chiotta M, Ponsone M, Combina M, Torres A, Chulze S.** *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. *Int J Food Microbiol*. 2009;136:137–141.
31. **Astoreca A, Magnoli C, Barberis C, Chiacchiera S, Combina M, Dalcero A.** Ochratoxin A production in relation to ecophysiological factors by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from different substrates in Argentina. *Sci Total Environ*. 2007;3880:16-23.
32. **Donoso A, Latorre B.** Caracterización del moho azul causado por *Penicillium* spp. en uva de mesa almacenada en frío. *Cien. Inv. Agr*. 2006;33(2):143-155.
33. **Romero S, Comerio R, Larumbe G, Ritieni A, Vaamonde G, Fernández V.** Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. *Int J Food Microbiol*. 2005;104:43-49.
34. **Franck J, Latorre B, Torres R, Zoffoli J.** The effect of preharvest fungicide and postharvest sulfur dioxide use on postharvest decay of table grapes caused by *Penicillium expansum*. *Postharvest Biol. Technol*. 2005;37:20–30.

35. **Magnoli C, Violante M, Combina M, Palacio G, Dalcero A.** Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus section Nigri* in wine grapes in Argentina. *Lett Appl Microbiol.* 2003;37:179–184.
36. **Da Rocha Rosa C, Palacios V, Combina M, Fraga M, Oliveira A, Magnoli C, et al.** Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Addit Contam.* 2002;19:408–414.
37. **Serra R, Braga A, Venâncio A.** Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. *Research in Microbiology.* 2005;156: 515–521.
38. **Bellí N, Bau M, Marín S, Abarca M, Ramos A, Bragulat M.** Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. *Int J Food Microbiol.* 2006;111:S40–S45.
39. **Sarigiannis Y, Kapolos J, Koliadima A, Tsegenidis T, Karaiskakis G.** Ochratoxin A levels in Greek retail wines. *Food Control.* 2014;42:139-143.
40. **Tamura M, Takahashi A, Uyama A, Mochizuki N.** A Method for Multiple Mycotoxin Analysis in Wines by Solid Phase Extraction and Multifunctional Cartridge Purification, and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Toxins.* 2012;4:476-486.
41. **Quintela S, Villarán M, López I, Elejalde E.** Ochratoxin A in Spanish exportation wine market. *Food Control.* 2012;25:501-504.
42. **Majerus P, Hain J, Kolb C.** Patulin in grape must and new, still fermenting wine (Federweißer). *Mycotoxin Research.* 2008;24(3):135-139.
43. **Shephard G, Fabiani A, Stockenström S, Mshicileli N, Sewram V.** Quantitation of Ochratoxin A in South African Wines. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51:1102-1106.
44. **Ponsone M, Chiotta M, Combina M, Knass P, Dalcero A, Chulze S.** Natural Occurrence of Ochratoxin A in Musts, Wines and Grape Vine Fruits from Grapes Harvested in Argentina. *Toxins.* 2010;2:1984-1996.
45. **Kruger C, Fernández A, Rosa C.** Ochratoxin A in wines from 2002 to 2008 harvest marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Addit Contam Part B.* 2012;5(3):204–207.
46. **Vega M, Ríos G, von Baer D, Mardones C, Tessini C, Herlitz E, et al.** Ochratoxin A occurrence in wines produced in Chile. *Food Control.* 2012;28:147-150.

47. **Chulze S, Magnoli C, Dalcero A.** Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. *Int J Food Microbiol.* 2006; 111: S5–S9.
48. **Pacin A, Resnik S, Vega M, Saelzer R, Ciano B, Ríos G, Martinez N.** Occurrence of ochratoxin A in wines in the Argentinian and Chilean markets. *ARKIVOC XII.* 2005:214-223.
49. **Shundo L, De Almeida A, Alaburda J, Ruvieri V, Navas S, Lamardo C, Sabino M.** OCHRATOXIN A IN WINES AND GRAPE JUICES COMMERCIALIZED IN THE CITY OF SÃO PAULO, BRAZIL. *Braz. J. of Microbiol.* 2006;37:533-537.
50. **Pitt J. I., Hocking A. D.** Fungi and Food spoilage. Blackie Academic and Professional. London; 1997.
51. **Pryor B.M, Michailides T.J.** Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. *Phytopathology.* 2002;42:406–416.
52. **Polizzotto R, Andersen B, Martini M, Grisan S, Assante G, Musetti, R.** A polyphasic approach for the characterization of endophytic *Alternaria* strains isolated from grapevines. *J. Microbiol. Methods.* 2012;88:162–171.
53. **Rotondo F, Collina M, Brunelli A, Pryor B.M.** Comparison of *Alternaria* spp. collected in Italy from apple with *A. mali* and other AM-toxin producing strains. *Phytopathology.* 2012;102:1130–1142.
54. **Van de Perre E, Deschuyffeleer N, Jacxsens L, Vekeman F, Van Der Hauwaert W, Asam S, et al.** Screening of moulds and mycotoxins in tomatoes, bell peppers, onions, soft red fruits and derived tomato products. *Food Control.* 2014;37:165-170.
55. **Nees von Esenbeck C. G.** Das System der Pilze und Schwämme. Würzburg; 1816. p. I-XXVII.
56. **Simmons E.** *ALTERNARIA*, An Identification Manual. 6a ed. The Netherland; 2007. p. 500-657.
57. **Samson R., Houbraken J., Thrane U., Frisvad J., Andersen B.** Food and Indoor Fungi. The Netherland; 2010. p. 210-307.
58. **Carrillo L. 2003.** Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta; 1999. pp. 128.

59. **Andersen B, Krøger E, Roberts R.** Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Mycological Research*. 2002;106(2):170-182.
60. **Ostry V.** *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal*. 2008;1(2):175-188.
61. **Terminiello L, Patriarca A, Pose G, Fernández Pinto V.** Occurrence of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in Argentinean tomato puree. *Mycotoxin Research*. 2006;22(4):236-240.
62. **Azcarate M.P, Patriarca A, Terminiello L, Fernández Pinto V.** *Alternaria* Toxins in Wheat during the 2004 to 2005 Argentinean Harvest. *J. Food Prot.* 2008;71(6):1262-1265.
63. **Visconti A. y Sibilia A.** *Alternaria* toxins. In: Miller, J.D. y Trenholm, H.L. (Eds.) *Mycotoxins in grain*. Eagan Press, St. Paul, MN, USA; 1994. p. 315-336.
64. **Da Motta S. y Valente L.** A method for the determination of two *Alternaria* toxins, Alternariol and Alternariol Monomethyl Ether, in Tomato products. *Braz J Microbiol*. 2000;31:315-320.
65. **Logrieco A, Moretti A, Solfrizzo M.** *Alternaria* toxins and diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal*. 2009;2(2):129-140.
66. **Montemurro N, Visconti A.** *Alternaria*: Biology, plant diseases and metabolites. Ed. Chelkowski J. Amsterdam, London, New York, Tokyo, 1992. 449-557 p.
67. **Swart A, Lennox C, Holz G.** Infection of Table Grape Bunches by *Alternaria alternata*. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 1995;16:3-6.
68. **Mostert L, Crous P.W, Petrini O.** Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia*. 2000;52:46-58.
69. **Martínez E.** Estudio de Especies Micotoxígenas del género *Penicillium*: *Penicillium verrucosum* [Tesis]. Barcelona (España): Universidad Autónoma de Barcelona; 2003.
70. **Welke J, Hoeltz M, Dottori H, Noll I.** Fungi and patulin in apples and the role of processing on patulin levels in juices: a study on naturally contaminated apples. *J. Food Saf.* 2010;30:276-287.

71. **Reports on tasks for scientific cooperation JECFA.** Assessment of dietary intake of patulin by the population of EU Member States. Berlin. 2002.
72. **Jones A.L, Aldwinckle H.S.** Compendium of Apple and Pear Diseases. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN; 1990.
73. **Rodriguez Romera M., Oriolani E., Combina M.** La Podredumbre Ácida de los Racimos de la Vid. 2010:11. Disponible en: <http://www.inv.gov.ar/PDF/Foro/2010/12-INTAPodredumbreAcidaDeRacimosDeVid19-08-10.pdf>
74. **Samson R., Hoekstra E., Frisvad J., Filtenborg O.** Introduction to Food and Airborne Fungi. 6a ed. The Netherland; 2002. p. 378–382.
75. **Li F, Toyazaki N, Yoshizawa T.** Production of *Alternaria* mycotoxins by *Alternaria alternata* isolated from weather-damaged wheat. J. Food Prot. 2001;64:567–571.
76. **Andersen B, Smedsgaard J, Frisvad J.** *Penicillium expansum*: Consistent Production of Patulin, Chaetoglosins, and Other Secondary Metabolites in Culture and Their Natural Occurrence in Fruit Products. J. Agric. Food Chem. 2004;52:2421-2428.
77. **Chiraz Z, Salwa A, Wafa H, Hassan B.** Occurrence of patulin in Apple-based-foods largely consumed in Tunisia. Food Control. 2013;31:263–267.
78. **INV (Instituto Nacional de Vitivinicultura).** La Nueva Vitivinicultura de la Región Patagónica Argentina; 2010. Disponible en: [www.inv.gov.ar/PDF/INFORME%20REGION%20%20SUR%20%202010.pdf](http://www.inv.gov.ar/PDF/INFORME%20REGION%20%20SUR%20%202010.pdf)
79. **Scott P.** Analysis of Agricultural Commodities and foods for *Alternaria* Mycotoxins. Journal of AOAC International. 2001;84(6):1809-1817.
80. **Scott P, Lawrence G, Lau P.** Analysis of wines, grape juices and cranberry juices for *Alternaria* toxins. Mycotoxin Research. 2006; 2(2):142-147.
81. **Tournas, V.H, Stack M.E.** Production of alternariol and alternariol methyl ether by *Alternaria alternata* grown on fruits at various temperatures. J. Food Prot. 2001;64:528–532.

## 10. ANEXOS

### 10.1 MEDIOS DE CULTIVO

#### 1. Agar Dicloran 18% Glicerol (DG18)

Glucosa	10g
Peptona	5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5g
Glicerol, A.R.	220g
Agar	15g
Dicloran	2mg
Cloranfenicol	100mg
Agua destilada	1000mL

Después de hervir 30 minutos se agrega 220g de glicerol.

#### 2. Agar Papa Dextrosa (PDA)

Papa	250g
Glucosa	20g
Agar	15g
Agua destilada	1000mL

#### 3. Agar Papa Dextrosa más antibióticos (PDA+C+D)

Papa	250g
Glucosa	20g
Agar	15g
Dicloran	1mL
Cloranfenicol	0.1g
Agua destilada	1000mL



4. Agar Papa Zanahoria (PZA)

Papa	20g
Zanahoria	20g
Agar	20g
Agua destilada	1000mL

5. Agar Czapek y Extracto de Levadura (CYA)

$K_2HPO_4$	1g
Czapek concentrado	10mL
Solución de trazas de metal	1mL
Extracto de levadura en polvo	5g
Sucrosa	30g
Agar	15g
Agua destilada	1000mL

6. Agar Extracto de Levadura (MEA)

$K_2HPO_4$	0.75g
Czapek concentrado	7.5mL
Extracto de levadura	3.7g
Glicerol, grado analítico	250g
Agar	12g
Agua destilada	750mL

7. Agar 25% Glicerol Nitrato (G25N)

Extracto de levadura en polvo	20g
Peptona	1g
Glucosa	20g
Agar	20g
Agua destilada	1000mL

8. Czapek concentrado

$\text{NaNO}_3$	30g
KCl	5g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1g
Agua destilada	1000mL

9. Agar sacarosa extracto de levadura (YES)

Extracto de levadura	20g
Sacarosa	150g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01g
$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.005g
Agar	20g
Agua destilada	1000mL

## 10.2 TABLAS DE DATOS

### 1. Producción de AOH, AME y AT por aislamientos de *Alternaria*.

#### a. AOH

	GRUPO - ESPECIE	CEPA	TIEMPO min	ÁREA	MASA INYECTADA ug	AOH mg/kg
1	<i>A. arborescens</i>	19 V1	3,541	4.939	0,014	0,003
2		1 V2	3,230	697.899	0,091	0,018
3		6 R2	3,550	2.063	0,014	0,003
4		8 R2	3,505	604.782	0,081	0,016
5		9 R2	3,497	18.013	0,016	0,003
6	<i>A. alternata</i>	23 V1	3,535	5.230	0,014	0,003
7		49 V1	3,564	5.640	0,014	0,003
8		51 V1	3,516	614.811	0,082	0,016
9		7 V2	3,521	404.586	0,059	0,012
10		12 V2	3,535	14.151	0,015	0,003
11	<i>A. tenuissima</i>	3 V1	3,898	698.968	0,091	0,018
12		4 V1	3,437	56.320	0,020	0,004
13		7 V1	3,549	86.494	0,023	0,005
14		9 V1	3,546	30.167	0,017	0,003
15		12 V1	3,555	74.314	0,022	0,004
16		14 V1	3,600	126.774	0,028	0,006
17		15 V1	3,916	2.425.996	0,283	0,057
18		17 V1	3,516	1.256.497	0,153	0,031
19		22 V1	3,532	2.003.730	0,236	0,047
20		24 V1	3,637	380.710	0,056	0,011
21		26 V1	3,587	58.351	0,020	0,004
22		27 V1	3,505	98.910	0,025	0,005
23		31 V1	3,506	231.731	0,039	0,008
24		32 V1	3,515	62.723	0,021	0,004
25		33 V1	3,519	1.300.971	0,158	0,032
26		34 V1	3,569	2.667	0,014	0,003
27		35 V1	3,614	1.699.740	0,202	0,040
28		36 V1	3,534	5.058	0,014	0,003
29		37 V1	3,554	2.349.218	0,275	0,055
30		40 V1	3,713	1.112.876	0,137	0,027
31		42 V1	3,619	403.253	0,058	0,012
32		43 V1	3,512	41.240	0,018	0,004

33	45 V1	3,636	740.725	0,096	<b>0,019</b>
34	47 V1	3,615	992.588	0,124	<b>0,025</b>
35	48 V1	3,539	1.536	0,014	<b>0,003</b>
36	50 V1	3,904	514.501	0,071	<b>0,014</b>
37	54 V1	ND	-	0,014	<b>ND</b>
38	63 V1	3,490	637.586	0,084	<b>0,017</b>
39	16 V2	3,210	7.463	0,014	<b>0,003</b>
40	28 V2	3,524	3.557	0,014	<b>0,003</b>
41	31 V2	3,517	38.879	0,018	<b>0,004</b>
42	32 V2	3,479	37.212	0,018	<b>0,004</b>
43	4 V6	3,805	60.571	0,020	<b>0,004</b>
44	2 R1	3,576	8.882	0,015	<b>0,003</b>
45	2 R2	3,518	151.327	0,030	<b>0,006</b>
46	3 R2	3,497	19.046	0,016	<b>0,003</b>
47	13 R2	3,424	164.113	0,032	<b>0,006</b>
48	16 R2	3,419	3.702	0,014	<b>0,003</b>
49	17 R2	3,573	310.704	0,048	<b>0,010</b>
50	18 R2	3,566	33.766	0,017	<b>0,003</b>

**ND:** No determinado

$$X_{AOH} = (Y + 122305) / 9000000$$

**b. AME**

	GRUPO - ESPECIE	CEPA	TIEMPO min	ÁREA	MASA INYECTADA ug	AME mg/kg
1	<i>A. arborescens</i>	19 V1	5,590	4.417	-0,041	ND
2		1 V2	5,655	1.006.293	0,085	0,017
3		6 R2	5,590	11.889	-0,040	ND
4		8 R2	5,542	1.019.623	0,086	0,017
5		9 R2	5,500	20.352	-0,039	ND
6	<i>A. alternata</i>	23 V1	5,583	18.252	-0,039	ND
7		49 V1	5,633	20.687	-0,039	ND
8		51 V1	5,567	1.214.749	0,111	0,022
9		7 V2	5,630	1.118.661	0,099	0,020
10		12 V2	5,599	42.098	-0,036	ND
11		3 V1	ND	-	-	ND
12		4 V1	5,449	32.992	-0,037	ND
13		7 V1	5,703	293.915	-0,004	ND
14		9 V1	5,628	89.674	-0,030	ND
15		12 V1	5,686	136.020	-0,024	ND
16		14 V1	5,907	41.138	-0,036	ND
17		15 V1	6,140	5.211.759	0,610	0,122
18		17 V1	5,642	2.323.103	0,249	0,050
19		22 V1	5,661	3.546.422	0,402	0,080
20		24 V1	5,988	353.319	0,003	0,001
21		26 V1	5,790	132.535	-0,025	ND
22		27 V1	5,587	1.031.612	0,088	0,018
23		31 V1	5,642	99.447	-0,029	ND
24	<i>A. tenuissima</i>	32 V1	5,628	87.340	-0,030	ND
25		33 V1	5,622	2.259.232	0,241	0,048
26		34 V1	5,658	36.612	-0,037	ND
27		35 V1	5,900	4.089.214	0,470	0,094
28		36 V1	5,580	30.359	-0,037	ND
29		37 V1	5,706	5.651.756	0,665	0,133
30		40 V1	6,210	1.663.988	0,167	0,033
31		42 V1	5,903	534.001	0,026	0,005
32		43 V1	5,611	85.425	-0,031	ND
33		45 V1	5,968	2.766.257	0,305	0,061
34		47 V1	5,883	2.273.622	0,243	0,049
35		48 V1	5,583	19.427	-0,039	ND
36		50 V1	5,972	185.577	-0,018	ND
37		54 V1	5,600	26.441	-0,038	ND
38		63 V1	5,497	490.174	0,020	0,004
39		16 V2	5,576	4.737	-0,041	ND

40		28 V2	5,561	19.790	-0,039	ND
41		31 V2	5,550	73.293	-0,032	ND
42		32 V2	5,471	53.532	-0,035	ND
43		4 V6	5,575	148.554	-0,023	ND
44		2 R1	5,665	23.140	-0,038	ND
45		2 R2	5,605	191.028	-0,017	ND
46		3 R2	5,550	45.305	-0,036	ND
47		13 R2	5,250	66.340	-0,033	ND
48		16 R2	5,282	20.650	-0,039	ND
49		17 R2	5,685	1.497.948	0,146	0,029
50		18 R2	5,686	100.524	-0,029	ND

**ND:** No determinado

$$X_{AME} = (Y - 329691) / 8000000$$

c. AT

	GRUPO - ESPECIE	CEPA	DILU CIÓN	TIEMPO min	ÁREA	MASA INYECTADA ug	AT mg/kg
1	<i>A. arborescens</i>	19 V1	-	7,481	10.431	0,082	<b>0,016</b>
2		1 V2	-	7,539	6.030.566	3,092	<b>0,618</b>
3		6 R2	-	7,527	35.715.196	17,934	<b>3,587</b>
4		8 R2	-	7,735	8.746.996	4,450	<b>0,890</b>
5		9 R2	-	7,585	26.295.280	13,224	<b>2,645</b>
6	<i>A. alternata</i>	23 V1	-	7,318	39.058	0,096	<b>0,019</b>
7		49 V1	-	7,608	26.385.224	13,269	<b>2,654</b>
8		51 V1	-	7,442	71.253	0,112	<b>0,022</b>
9		7 V2	1/10	6,549	100.775.620	50,464	<b>10,093</b>
10		12 V2	-	7,579	33.290.920	16,722	<b>3,344</b>
11	<i>A. tenuissima</i>	3 V1	1/10	6,513	210.156.620	105,155	<b>21,031</b>
12		4 V1	-	7,516	5.366	0,079	<b>0,016</b>
13		7 V1	-	6,057	39.599.648	19,876	<b>3,975</b>
14		9 V1	-	7,593	25.964.034	13,058	<b>2,612</b>
15		12 V1	-	7,349	24.467	0,089	<b>0,018</b>
16		14 V1	-	6,491	98.718	0,126	<b>0,025</b>
17		15 V1	1/10	6,533	196.068.980	98,111	<b>19,622</b>
18		17 V1	1/10	6,521	162.168.120	81,160	<b>16,232</b>
19		22 V1	-	6,106	33.784.916	16,969	<b>3,394</b>
20		24 V1	1/10	6,516	89.885.520	45,019	<b>9,004</b>
21		26 V1	-	6,699	447.843	0,300	<b>0,060</b>
22		27 V1	1/10	7,251	159.706.140	79,929	<b>15,986</b>
23		31 V1	-	6,080	2.127.198	1,140	<b>0,228</b>
24		32 V1	-	6,111	9.389.639	4,771	<b>0,954</b>
25		33 V1	-	6,141	19.879.360	10,016	<b>2,003</b>
26		34 V1	-	7,350	115.705	0,134	<b>0,027</b>
27		35 V1	1/10	6,560	72.410.740	36,282	<b>7,256</b>
28		36 V1	-	7,342	92.089	0,122	<b>0,024</b>
29		37 V1	-	6,757	74.923	0,114	<b>0,023</b>
30		40 V1	-	6,809	17.253	0,085	<b>0,017</b>
31		42 V1	-	7,014	16.078.384	8,115	<b>1,623</b>
32		43 V1	-	6,789	40.047	0,096	<b>0,019</b>
33		45 V1	-	6,776	12.477	0,083	<b>0,017</b>
34		47 V1	-	6,756	33.781	0,093	<b>0,019</b>
35		48 V1	-	7,438	2.462.279	1,307	<b>0,261</b>
36		50 V1	1/10	6,493	32.420.720	16,287	<b>3,257</b>
37		54 V1	-	7,415	3.784.128	1,968	<b>0,394</b>
38		63 V1	-	7,725	43.265	0,098	<b>0,020</b>
39		16 V2	-	7,314	67.314	0,110	<b>0,022</b>

40		28 V2	-	7,471	3.997.374	2,075	<b>0,415</b>
41		31 V2	-	7,733	175.188	0,164	<b>0,033</b>
42		32 V2	-	7,137	7.079	0,080	<b>0,016</b>
43		4 V6	-	7,538	36.848.624	18,501	<b>3,700</b>
44		2 R1	-	7,584	10.977.748	5,565	<b>1,113</b>
45		2 R2	-	7,593	9.829.247	4,991	<b>0,998</b>
46		3 R2	-	7,646	5.723.422	2,938	<b>0,588</b>
47		13 R2	-	7,366	27.069	0,090	<b>0,018</b>
48		16 R2	-	7,643	18.643.990	9,398	<b>1,880</b>
49		17 R2	1/10	7,774	120.154.710	60,154	<b>12,031</b>
50		18 R2	-	7,325	93.684	0,123	<b>0,025</b>

$$X_{AT} = (Y + 152611) / 2000000$$



## 2. Producción de Patulina por aislamientos de *Penicillium expansum*.

### a. A partir de pequeños cilindros de agar “plugs” de los medios CYA y YES.

	CEPA	TIEMPO (min)	ÁREA	PESO PLUG (g)	PATULINA INYECTADA (ug)	ug PATULINA /g PLUG
1	2 vo V1	5,609	995.875	0,5	96,511	193,022
2	7 V1	5,532	455.663	0,5	44,150	88,300
3	10 V1	5,403	2.069.978	0,6	200,621	334,369
4	2 V2	5,330	280.222	0,5	27,145	54,290
5	6 V2	5,327	1.437.847	0,5	139,350	278,701
6	1 V3	5,341	1.067.760	0,5	103,479	206,958
7	3 V6	5,634	535.276	0,6	51,867	86,444
8	1 V7	5,379	486.276	0,6	47,117	78,529
9	2 V7	5,536	200.879	0,6	19,454	32,424
10	4 V7	5,597	1.251.611	0,6	121,299	202,165
11	5 V7	5,579	1.817.517	0,8	176,151	220,189
12	6 V7	5,553	703.536	0,6	68,176	113,626
13	7 V7	5,370	897.585	0,6	86,984	144,974
14	9 V7	5,496	596.261	0,6	57,778	96,296
15	10 V7	5,608	35.441	0,5	3,419	6,838
16	11 V7	5,632	318.064	0,6	30,813	51,355
17	13 V7	5,350	1.603.529	0,6	155,410	259,016
18	14 V7	5,496	604.043	0,5	58,532	117,064
19	15 V7	5,339	1.002.397	0,5	97,143	194,287
20	16 V7	5,482	998.265	0,5	96,743	193,486
21	17 V7	5,435	1.489.584	0,6	144,365	240,609
22	18 V7	5,354	1.449.563	0,6	140,486	234,143
23	19 V7	5,539	1.106.097	0,6	107,195	178,658
24	20 V7	5,438	856.551	0,6	83,007	138,345
25	21 V7	5,388	1.487.623	0,6	144,175	240,292
26	22 V7	5,339	1.022.280	0,6	99,071	165,118
27	23 V7	5,347	1.774.591	0,8	171,990	214,988
28	24 V7	5,626	1.990.269	0,6	192,895	321,492
29	26 V7	5,557	593.791	0,7	57,538	82,198
30	27 V7	5,359	1.023.231	0,5	99,163	198,326
31	28 V7	5,533	1.611.389	0,5	156,171	312,343
32	29 V7	5,531	1.316.374	0,6	127,576	212,627
33	31 V7	5,521	1.279.685	0,6	124,020	206,700
34	36 V7	5,535	1.079.265	0,6	104,594	174,323
35	37 V7	5,532	966.755	0,6	93,689	156,148
36	40 V7	5,513	1.085.160	0,6	105,165	175,276

<b>37</b>	<b>1 V8</b>	5,350	1.201.347	0,6	116,427	<b>194,045</b>
<b>38</b>	<b>3 V8</b>	5,331	531.496	0,5	51,500	<b>103,000</b>
<b>39</b>	<b>4 V8</b>	5,420	112.098	0,3	10,849	<b>36,163</b>
<b>40</b>	<b>5 V8</b>	5,338	92.596	0,4	8,959	<b>22,397</b>
<b>41</b>	<b>6 V8</b>	5,338	62.481	0,4	6,040	<b>15,099</b>
<b>42</b>	<b>8 V8</b>	5,382	568.255	0,5	55,063	<b>110,126</b>
<b>43</b>	<b>9 V8</b>	5,586	399.653	0,4	38,721	<b>96,802</b>

$$X_{PATUL} = (Y + 168.69) / 10317$$

**b. Desde un sustrato natural, manzanas**

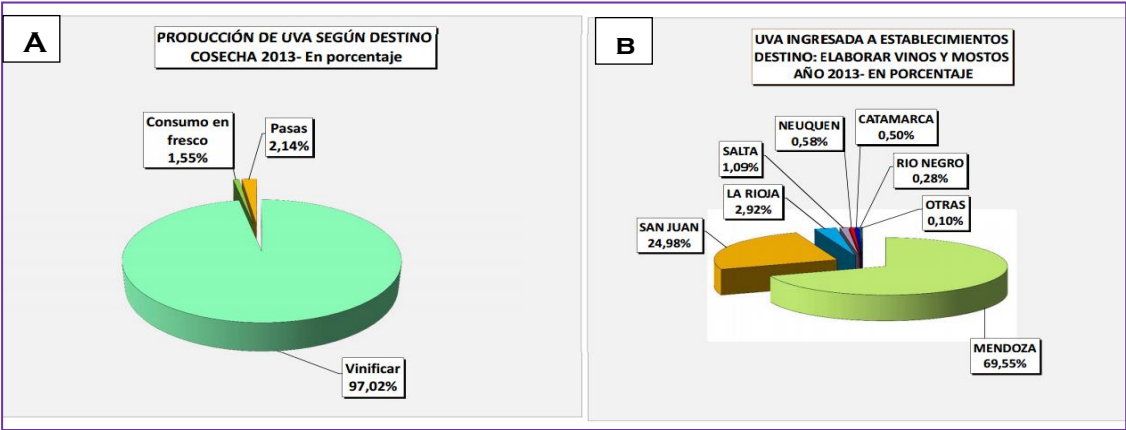
	CEPA	TIEMPO (min)	ÁREA	PESO MZ (g)	PATULINA INYECTADA (ug)	ug PATULINA /g MZ
1	2 vo V1	5,231	196.920	2,7	19,071	7,063
2	7 V1	5,166	280.375	2,7	27,160	10,059
3	10 V1	5,225	109.704	2,7	10,617	3,932
4	2 V2	5,546	58.403	3,2	5,645	1,764
5	6 V2	5,222	83.142	3	8,042	2,681
6	1 V3	ND	0	2,8	0,000	0,000
7	3 V6	5,243	623.116	2,8	60,381	21,565
8	1 V7	5,286	37.381	2,6	3,607	1,387
9	2 V7	5,548	210.349	2,7	20,372	7,545
10	4 V7	5,229	1.013.141	2,7	98,185	36,365
11	5 V7	5,281	648.151	2,5	62,807	25,123
12	6 V7	5,237	631.518	2,9	61,195	21,102
13	7 V7	5,273	20.550	2	1,976	0,988
14	9 V7	5,138	105.881	3,3	10,246	3,105
15	10 V7	5,228	610.432	2,8	59,151	21,125
16	11 V7	5,229	475.585	3	46,081	15,360
17	13 V7	5,229	34.059	2,7	3,285	1,217
18	14 V7	5,285	21.440	2,1	2,062	0,982
19	15 V7	5,553	115.294	2,6	11,159	4,292
20	16 V7	5,244	431.544	3,5	41,812	11,946
21	17 V7	5,196	7.156	3,2	0,677	0,212
22	18 V7	5,548	36.526	3,3	3,524	1,068
23	19 V7	5,261	7.375	2,7	0,698	0,259
24	20 V7	5,267	93.530	3	9,049	3,016
25	21 V7	5,241	175.222	2,8	16,967	6,060
26	22 V7	5,179	24.381	2,8	2,347	0,838
27	23 V7	5,618	11.126	2,7	1,062	0,393
28	24 V7	5,214	508.671	3	49,288	16,429
29	26 V7	5,557	530.936	3,2	51,446	16,077
30	27 V7	5,555	639.012	3,2	61,921	19,350
31	28 V7	5,552	1.111.263	2,5	107,695	43,078
32	29 V7	5,566	416.590	3	40,363	13,454
33	31 V7	5,242	578.657	2,8	56,071	20,025
34	36 V7	5,549	31.073	2,7	2,995	1,109
35	37 V7	5,555	334.561	2,7	32,412	12,004
36	40 V7	5,248	547.017	2,6	53,005	20,386
37	1 V8	ND	0	2,5	0,000	0,000
38	3 V8	5,235	13.772	2,8	1,319	0,471
39	4 V8	5,214	252.667	2,9	24,474	8,439
40	5 V8	5,229	31.911	2,1	3,077	1,465

<b>41</b>	<b>6 V8</b>	5,183	19.800	2,7	1,903	<b>0,705</b>
<b>42</b>	<b>8 V8</b>	5,208	82.731	2,5	8,003	<b>3,201</b>
<b>43</b>	<b>9 V8</b>	5,235	272.284	2,8	26,375	<b>9,420</b>

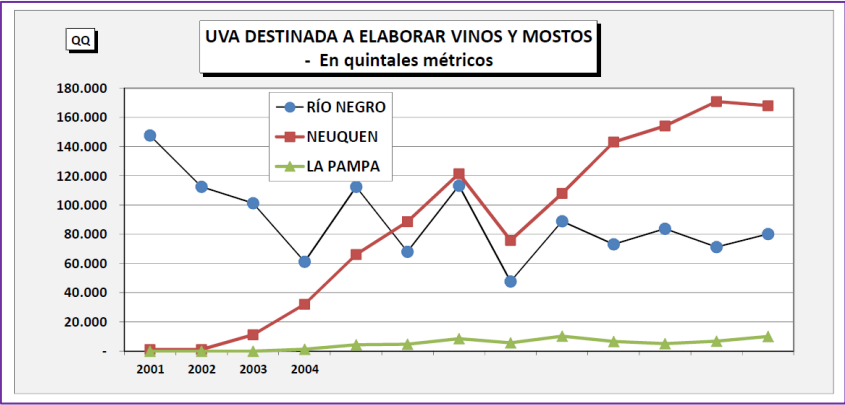
**ND:** No determinado

$$X_{\text{PATUL}} = (Y + 168.69) / 10317$$

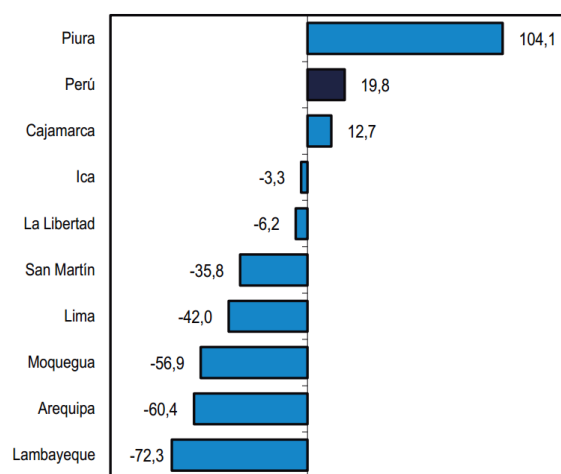
10.3 FIGURAS



**Fig. Nº1:** A) Producción de uva según destino. B) Porcentajes de producción de uva para vinificación de cada región argentina <sup>14</sup>.

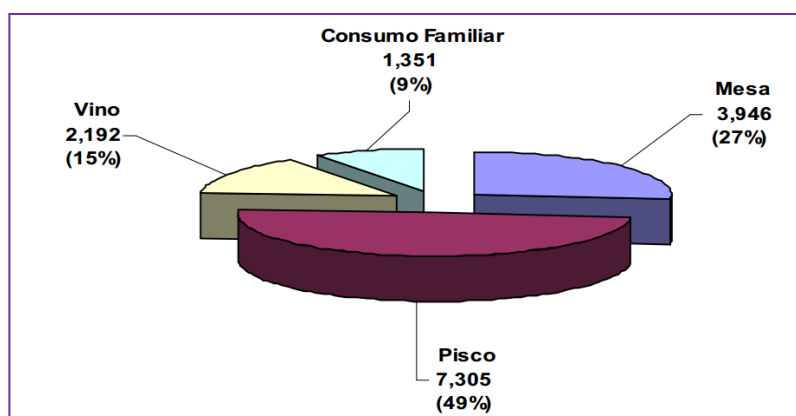


**Fig. Nº2:** Producción de uva de la Región sur de la Argentina. Año 2013 <sup>14</sup>.



Fuente: Ministerio de Agricultura y Riego.

**Fig. N°3:** Producción de uva, variación porcentual de uva, variación porcentual Diciembre 2013/2012 <sup>16</sup>.



**Fig. N°4:** Destino de la producción de uvas en el Perú (ha) <sup>17</sup>.



**Fig. N°5:** Recepción de las muestras. A) Muestra embolsada, B-D) Uvas con evidente deterioro.



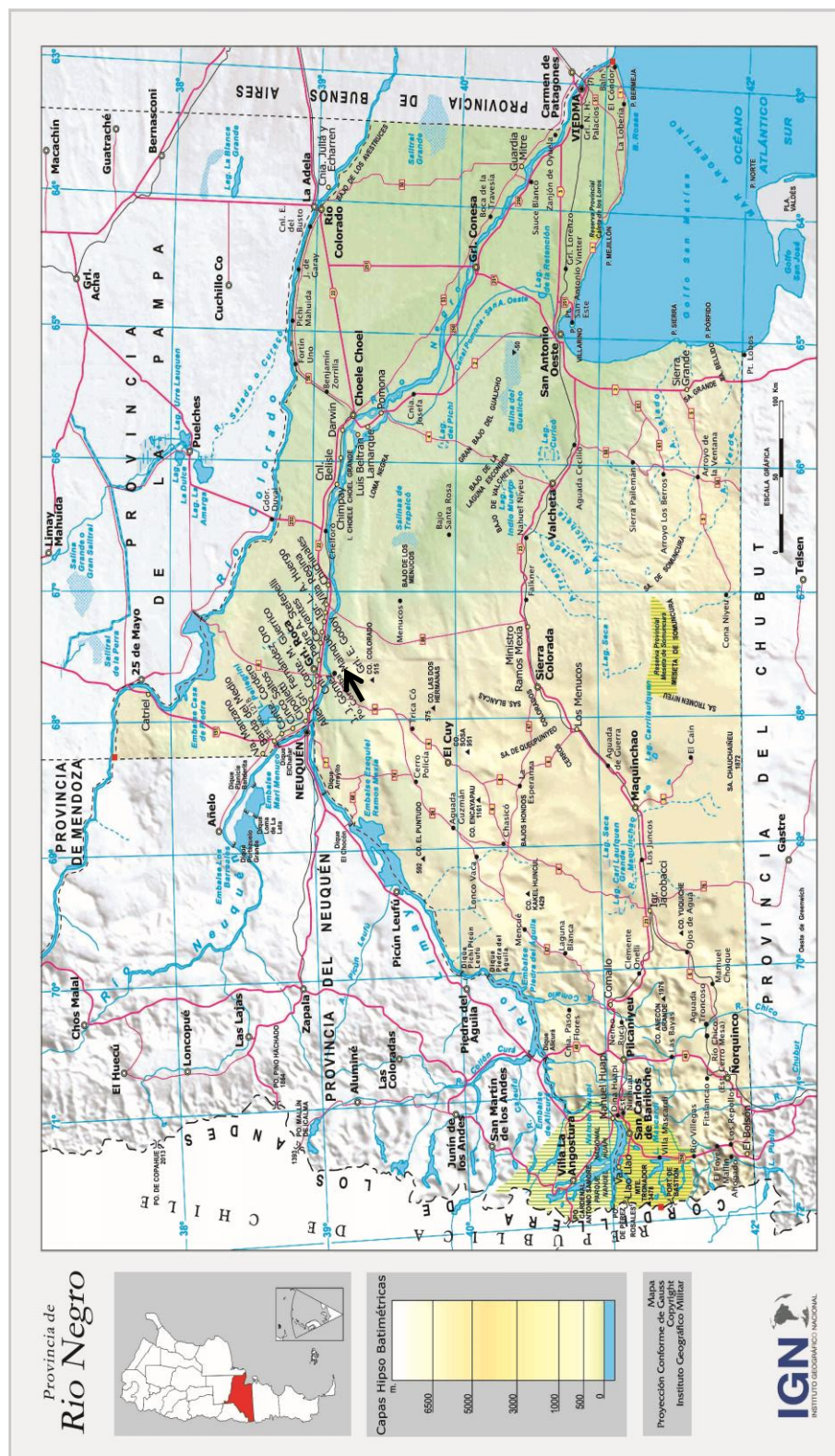
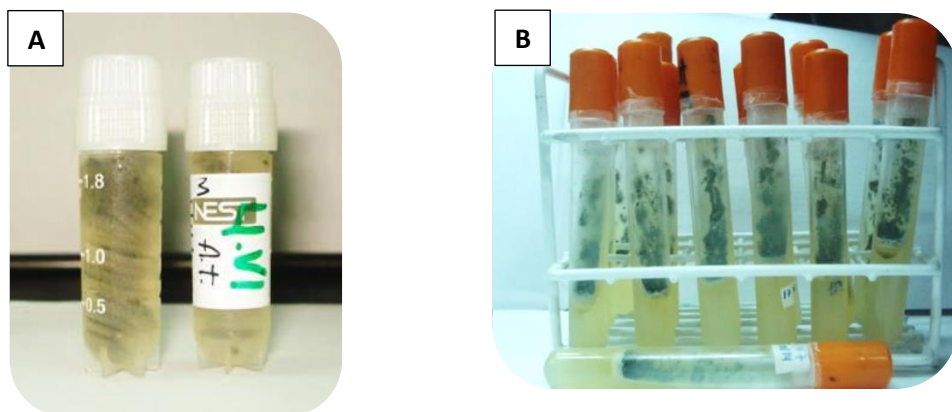


Fig. N°6: Viñedos de Valle Azul.

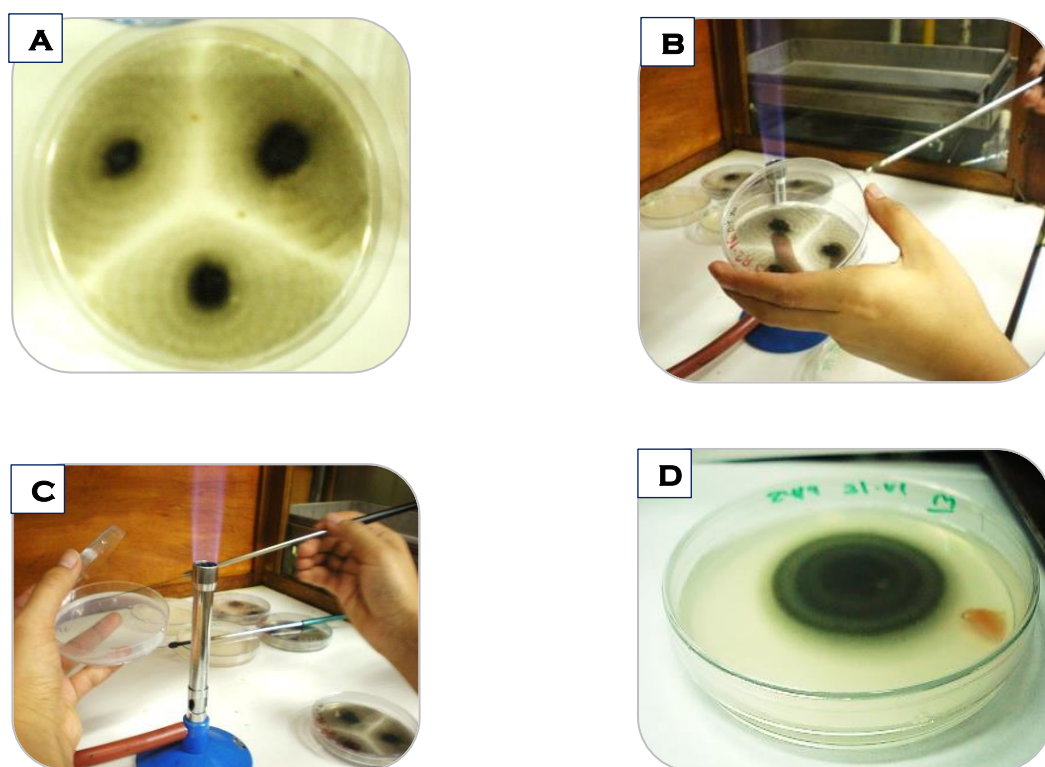




Fig. N°7: Muestreo. Zona de recolección de muestras.



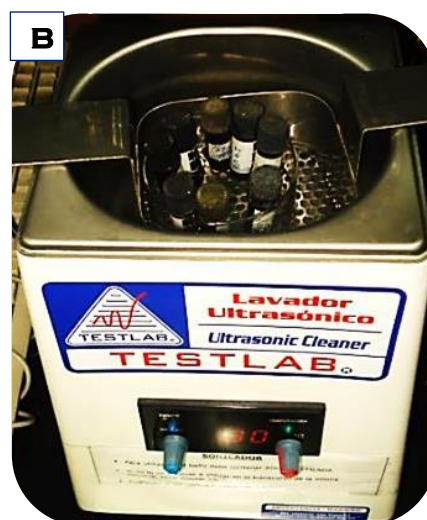
**Fig. N°8:** Conservación. A) Microtubos con cepas de *Alternaria*. B) Tubos con cepas de *Penicillium*.



**Fig. N°9:** A) Cultivo de *Alternaria* de 7 días. B) Recolección de conidios de los cultivos. C) Siembra en PZA sobre 6 gotas de Tween 80. D) Cultivo monospórico de 7 días.



**Fig. N°10:** Material de extracción de toxinas de *Alternaria*.



**Fig. N°11:** A) Equipo HPLC. B) Sonicador.